

**Einfluss von Rotwein auf
parodontopathogene Bakterienstämme
im Zusammenhang mit
U 937-Monozyten**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Carolin Köditz
geboren am 24.02.1973 in Zwickau

Gutachter

1. Prof. Dr. S. Eick, Bern/CH
2. PD Dr. Dr. B. W. Sigusch, Jena
3. Prof. Dr. H. Jentsch, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. September 2010

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. a./A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom
AP-1	Activator Protein-1
ATCC.....	American Type Culture Collection
BSA	Rinderserumalbumin
CDT.....	Cytolethal Distending Toxin
CoA	Coenzym A
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CXC.....	Cystein-X-Cystein
CXCR	Cystein-X-Cystein Rezeptor
DNA.....	Desoxyribonucleinsäure
EGCG	Epigallocatechingallate
ELISA.....	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
HACEK.....	<i>Hämophilus parainfluenzae</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Kingella kingae</i>
HDL.....	High Density Lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC.....	High Pressure Liquid Chromatography
IgG	ImmunglobulinG
IL	Interleukin
IL-1R.....	Interleukin-1 Rezeptor
iNOS	induced Nitric Oxide Synthetase
KBE.....	Kolonie bildende Einheiten
kDa.....	kiloDalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL.....	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MPM.....	Mäuseperitonealmakrophagen
MTT.....	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide
Na ⁺ / K ⁺ ATPase.....	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
oz	Unze
PBS	Phosphate Buffered Saline
<i>P. g. / P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

Abkürzungsverzeichnis

PMNs.....	Polymorphkernige Neutrophile
PRG.....	Plasminresistentes Gammaglobulin
PRPs.....	Prolinreiche Proteine
ROS.....	Reactive Oxygen Spezies
RPMI.....	Roswell Park Memorial Institute
RTX.....	Repeat in Toxin
SDS.....	sodium dodecyl sulphate
TGF.....	Transforming Growth Factor
TMB.....	3,3',5'-tetramethylbenzidine
TNF.....	Tumornekrosefaktor
TNF-R.....	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
T-TBS.....	tris buffered saline

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Parodontitis - das Krankheitsbild	3
2.2	Charakteristik auserwählter parodontopathogener Bakterienspezies	5
2.3	Aktivierung und Wirkungsweise proinflammatorischer Zytokine	10
2.4	Oxidativer Stress und Antioxidantien	13
2.5	Rotwein und sein Bestandteil Resveratrol	14
3	Ziele der Arbeit	23
4	Material und Methoden	25
4.1	Zelllinie, Zellkultivierung und Bestimmung der Zellzahl	25
4.2	Versuchsansatz mit U 937-Zellen, Bakterienstämmen und Rotwein bzw. Resveratrol	25
4.3	Messung der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α	29
4.4	Versuchsansatz mit Rotwein bzw. Resveratrol und Bakterienstämmen, ohne U 937-Zellen	31
4.5	MTT-Nachweis zur Bestimmung der Zytotoxizität	32
4.6	Statistische Auswertung	33
5	Ergebnisse	35
5.1	U 937-Zellen, Bakterien und Resveratrol bzw. Rotwein	35
5.2	Messung der Zytokine	38
5.3	Bakterienstamm und Resveratrol bzw. Rotwein, ohne U 937-Zellen	43
5.4	MTT-Nachweis zur Bestimmung der Zytotoxizität	46
6	Diskussion und Schlussfolgerung	51
6.1	Methodik	51
6.2	Wirkt Rotwein und / oder das Polyphenol Resveratrol bacterizid?	52
6.3	Verändert Rotwein und / oder das Polyphenol Resveratrol das Phagozytoseverhalten der stimulierten U 937-Zellen?	53
6.4	Können Rotwein, Resveratrol und andere Polyphenole die Interleukinausschüttung unterdrücken?	54
6.5	Sind Rotwein, Resveratrol oder andere Polyphenole zytotoxisch?	58
6.6	Schlussfolgerung	60

Inhaltsverzeichnis

7	Literaturverzeichnis	61
8	Tabellenanhang	70
	Lebenslauf	79
	Danksagung	81
	Ehrenwörtliche Erklärung	82

1 Zusammenfassung

Die pathogenen Mikroorganismen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* spielen eine entscheidende Rolle bei der Manifestation und Progression parodontaler Erkrankungen. *A. actinomycetemcomitans* kann eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Interleukine aus Wirtszellen induzieren, wohingegen *P. gingivalis* bekannt dafür ist, die vom Wirtsorganismus sezernierten Zytokine mittels seiner Proteasen abbauen zu können. Beide Spezies sind somit in der Lage, die Immunantwort zu modulieren und tragen wesentlich zum Fortbestehen einer Parodontitis bei. Das antiinflammatorische und antioxidative Potential von Rotwein und von Resveratrol könnte zur präventiven Behandlung parodontaler Erkrankungen beitragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Rotwein und von Resveratrol auf die Interleukinbildung makrophagenähnlicher Zellen nach Infektion mit den parodontopathogenen Bakterien zu untersuchen. Ebenso sollte die Wirkung von Rotwein und von Resveratrol auf die planktonisch vorkommenden, sowie adhären und invasiven Bakterien eruiert werden.

Die Durchführung der Versuche erfolgte an der permanenten promonozytären U 937-Zelllinie. Die Zellen wurden mittels Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) zur Makrophagenproliferation stimuliert. Danach wurden diese mit den Bakterienstämmen *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* M 5-1-2 infiziert. Die Konzentration des Rotweins betrug 0,1 %, 1 % und 10 %, Resveratrol wurde in einer Dosierung von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml verwendet. Die infizierten Zellen wurden 1 h, 6 h und 18 h inkubiert. Zur Bestimmung der planktonisch vorkommenden Bakterien wurden die Überstände aus den Zellkulturflaschen entnommen und auf Agarplatten ausgestrichen. Die Gewinnung der Proben, die später mittels ELISA-Technik auf das Vorhandensein der Zytokine Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α untersucht werden sollten, erfolgte ebenso. Abschließend wurde durch eine induzierte Zelllyse die Anzahl der adhären und invasiven Bakterien mittels Ausstrich auf Agarplatten ermittelt. Die Zytotoxizität von Rotwein und von Resveratrol wurde durch eine MTT-Testreihe untersucht.

Die Reduktion planktonisch vorkommender Bakterien bei 1 % igem und 10 % igem Rotweinzusatz betrug zwischen 26 % und 100 %, während Resveratrol keinen Einfluss auf deren Anzahl ausübte. Eine konzentrationsabhängige Verringerung der Adhärenz und Invasion des *P. gingivalis* M 5-1-2 konnte beim Zusatz von Resveratrol beobachtet werden. Bei 1 % igem und 10 % igem Rotweinzusatz konnte bei beiden *P. gingivalis*-Spezies eine erhebliche Abnahme des Phagozytoseverhaltens um 61 % bis 99,9 % festgestellt werden. *P. gingivalis* bewirkte zu keiner Zeit eine IL-8-Sekretion. Wurde den *A. actinomycetemcomitans* Y4-Versuchsproben Resveratrol zugesetzt, konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der IL-8-Bildung festgestellt werden. Eine deutliche Reduktion dieses Interleukins war bei 1 % igem Rotweinzusatz zu beobachten, während bei 10 % Rotwein kein IL-8 nachweisbar war. Die Sekretion von TNF- α wurde auch in Gegenwart von allen drei Bakterienspezies nur bei 10 % igem Rotweinzusatz induziert. 10 % Rotwein wirkt jedoch auch zytotoxisch. Die hohe Freisetzung von TNF- α in den Proben mit 10 % igem Rotweinzusatz könnte darauf zurück zu führen sein.

Da bereits geringe Konzentrationen an Rotweinzusatz die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine unterdrücken, könnte ein leichter Rotweinkonsum sich günstig in der Verhinderung einer Parodontitis sowie deren Therapie auswirken. Das wird durch die bakterizide Wirkung auf parodontopathogene Bakterien unterstützt.

2 Einleitung

2.1 Parodontitis - das Krankheitsbild

Die Parodontitis ist eine entzündliche, durch Zahnplaque verursachte Erkrankung aller Teile des marginalen Zahnhalteapparates. Sie führt zu Taschenbildung durch Ablösung der kollagenen Fasern vom Zement, fortschreitendem Attachmentverlust und einer irreversiblen Resorption des Alveolarknochens (Armitage 2004), dessen Folge der Verlust von Zähnen sein kann (Flemmig 1999, Kinane et al. 2001).

Die Parodontitis ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des Menschen (Henderson et al. 2003).

Aufgrund dieser Tatsache, ist der Erwerb neuer Erkenntnisse über diese Krankheit und ihre Therapiemöglichkeiten von großem Interesse für Patienten und Zahnärzte.

2.1.1 Ätiologie

Parodontopathien entstehen durch primäre oder sekundäre Ursachen. Der Hauptursachenkomplex ist die Zahnplaque mit den darin enthaltenen Bakterien (Haffajee und Socransky 1994, Darveau et al. 1997, Axelsson et al. 2002). 1 mg Plaque beherbergt 200 Millionen Bakterien (Socransky 1970). Bei einer Parodontitis ist vor allem die subgingivale Plaque krankheitsauslösend, da sie durch das sauerstoffarme Milieu viele gramnegative anaerobe Bakterien enthält, welche mittels ihrer Enzyme und / oder Stoffwechselendprodukte das Gewebe schädigen (Theilade 1986).

Der sekundäre Ursachenkomplex beinhaltet lokale und systemische Faktoren. Zahnfehlstellungen, fehlerhafte oder defekte konservierende und prothetische Zahnrestorationen, aktive Kariesläsionen, Wurzelfrakturen, Zahnwurzelresorptionen und Zementtropfen zählen zu den lokalen Faktoren. Sie begünstigen eine Retention der supra- und subgingivalen Zahnplaque (Albandar et al. 1995, Papapanou 1996, Albandar und Rams 2002).

Systemische Erkrankungen können durch eine Reduktion der Anzahl und durch Funktionseinbußen der polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) eine Parodontitis hervorrufen. Dabei wären Krankheiten wie Diabetes mellitus, Hämatopathien (z. B. Neutropenie),

HIV / AIDS und genetische Dispositionen (z. B. Down Syndrom, Papillon-Lefèvre Syndrom) zu nennen.

Rauchen, emotionaler Stress, Hormonumstellungen während der Schwangerschaft und die Einnahme von Kontrazeptiva können ebenfalls Entzündungen des Parodonts herbeiführen (Kinane 1999, Kinane und Chestnutt 2000, Johnson und Hill 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass Koronare Herzerkrankungen (KHK) und parodontale Entzündungen miteinander assoziiert sind (Kinane und Marshall 2001).

2.1.2 Pathogenese

Plaqueinduzierte Parodontitiden sind mit spezifischen Bakteriengruppen assoziierte Mischinfektionen. Das Erscheinungsbild ist sehr variabel, sowie abhängig von der Immunantwort auf die parodontopathogenen Keime und beeinflussbar durch genetische, umweltbedingte und erworbene Faktoren (Page und Kornman 1997, Armitage et al. 2003).

Die Parodontitis beginnt als Gingivitis, welche reversibel und nicht destruktiv ist und durch mechanische Reinigung der Zahnoberflächen geheilt werden kann. Bleibt diese Reinigung jedoch aus, siedeln sich vermehrt anaerobe Bakterienpopulationen an, welche zu erhöhter Produktion von hydrolytischen Enzymen führen. Die Plasmaexsudation und Phagozytenmigration nimmt zu. Die epitheliale Anheftung an der Zahnoberfläche wandert nach apikal – es bildet sich eine Zahnfleischtasche. Das Zusammenspiel zwischen mikrobieller Invasion und Immunreaktion des Körpers ist gestört. Es kommt zum Gewebe- und Knochenabbau, größtenteils verursacht durch die direkte enzymatische Aktivität der Entzündungszellen. Das Ergebnis ist eine irreversible Zerstörung des Parodonts und kann mit Zahnverlust verbunden sein (Kornman et al. 1997).

Die Parodontitis kann in chronischer oder aggressiver Form auftreten. Ersteres kommt meistens bei über 30 jährigen Patienten vor und ist gekennzeichnet durch eine hohe Plaqueakkumulation, subgingivalen Zahnstein, eine entzündete Gingiva, Zahnfleischtaschen und Attachmentverlust. Sie verläuft langsam progredient mit Phasen schnelleren Fortschreitens (Armitage 2004).

Die aggressive Parodontitis wird meist bei Jugendlichen diagnostiziert, welche klinisch gesund erscheinen, aber einen raschen Attachmentverlust und starke Knochenresorption aufweisen. Sie ist nicht zwingend plaqueinduziert. Eine familiäre Häufung ist oft beobachtbar. Die Menge der parodontopathogenen Keime können im Missverhältnis zur Destruktion des Parodonts stehen. Die Immunabwehr des Patienten ist meist geschwächt,

bedingt durch eine abnormale Phagozytenfunktion und einem hyperresponsiven Makrophagenphänotyp mit erhöhter Prostaglandin E2 und IL-1-Produktion (Armitage 2004).

2.1.3 Therapie

Eine Therapie dient der Vorbeugung des Krankheitsprozesses, soll ihn verlangsamen oder sogar zum Stillstand bringen und eine Regeneration des betroffenen Parodontiums bewirken (Wang und Greenwell 2001).

Das Ziel ist, die pathogenen Organismen in der Plaque der Zahnoberfläche oder in anderen Nischen der Mundhöhle zu eliminieren. Eine regelmäßige professionelle Zahnreinigung ist induziert, um längerfristig ein entzündungsfreies Parodontium sicher zu stellen. Neben den Mundhygieneinstruktionen werden auch mechanische und chemotherapeutische Behandlungen angewandt.

Die mechanischen Methoden beinhalten das supra- und subgingivale Scaling und Root Planing mit Handinstrumenten oder ultraschallbetriebenen Instrumenten. Dieses Vorgehen dient der Entfernung der Plaque und des infektiösen Gewebes.

Zur chemotherapeutischen Behandlung gehört die lokale Applikation von antiseptischen Pharmaka (z. B. Chlorhexidin) und die systemische Antibiotikagabe (Drisko 2001).

Versagen diese nicht chirurgischen Therapiemethoden, kann eine chirurgische Behandlung in Betracht gezogen werden. Dabei wird mittels verschiedener Operationsverfahren das infizierte Taschengewebe entfernt und somit die Zahnfleischtasche eliminiert (Wang und Greenwell 2001).

2.2 Charakteristik auserwählter parodontopathogener Bakterienspezies

Mehr als 400 Bakterienarten können in einer bezahnten Mundhöhle gefunden werden. Eine parodontale Tasche kann pro Messpunkt 300 verschiedene Spezies mit einer Konzentration von 10^8 Mikroorganismen aufweisen (Moore und Moore 1994). Meist sind die Bakterien saprophytär, also lösen keine pathologischen Veränderungen aus. Von einigen Spezies ist aber bekannt, dass sie maßgeblich an der Entstehung und der Progression parodontaler Erkrankungen beteiligt sind. Zu den am meisten pathogenen Spezies gehören *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*, die nachfolgend genauer beschrieben werden (Fives-Taylor et al. 1999, Holt et al. 1999). Des weiteren sind *Tannerella forsy-*

thia, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Streptococcus intermedius*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium nodatum* und *Eikenella corrodens* involviert (Flemmig 1999).

2.2.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans ist ein nichtbewegliches, nicht sporenbildendes, gramnegatives und fakultativ anaerobes Stäbchen. Es wurde erstmals im Jahre 1912 als Begleitkeim der Aktinomykose isoliert (Klinger 1912). 1950 wurde *A. actinomycetemcomitans* von Heinrich und Pulverer als Keim der normalen menschlichen Mundflora entdeckt (Heinrich und Pulverer 1959). Er siedelt sich an Zähnen, Schleimhaut und Oropharynx an. Kilian und Schiott (1975) konnten *A. actinomycetemcomitans* im dentalen Plaque isolieren und ein Jahr später wurde von Newman et. al. dieser Bakterienstamm als Ursache der juvenilen Parodontitis, heute lokalisierte aggressive Parodontitis genannt, postuliert (Newman et al. 1976). *A. actinomycetemcomitans* gehört zu den Frühbesiedlern der Zahnoberfläche, da er bereits 2–6 h nach der Zahnreinigung nachweisbar ist (Li et al. 2004).

A. actinomycetemcomitans gilt als Leitkeim der lokalisierten aggressiven Parodontitis und kann als Mitglied der HACEK-Gruppe Ursache für eine infektiöse Endokarditis sein (van Winkelhoff und Slots 1999, Slots und Ting 1999).

Die idealen Wachstumsbedingungen herrschen bei einer Temperatur von 37° C, einer Atmosphäre angereichert mit 5–10 % CO₂ und einem pH-Wert von 7–8 (Sreenivasan et al. 1993). *A. actinomycetemcomitans* bildet auf dem Agar kleine, rundliche, helle Kolonien mit sternförmiger Struktur im Zentrum und einem Durchmesser von 1–2 mm. Es können Stämme mit glatter und transparenter Oberfläche (smooth colonies) von solchen mit rauer und opaker Oberfläche (rough colonies) unterschieden werden. Diese unterschiedlichen Erscheinungsbilder entstehen durch das Vorhandensein von Fimbrien bei den opaken Kulturen (Rosan et al. 1988).

Die Einteilung erfolgt in sechs Serotypen von a–f, welche durch die Ausbildung spezifischer Antikörper begründet ist (Kaplan et al. 2002). Es wird davon ausgegangen, dass alle Serotypen pathogenes Potential besitzen (Kaplan et al. 2002).

2.2.1.1 Virulenzfaktoren

Die Adhärenz der Mikroorganismen ist für die Kolonisation erforderlich und hat eine Schlüsselposition innerhalb der Virulenzfaktoren. Der Wirtskontakt gelingt

A. actinomycetemcomitans durch lange gebündelte Fimbrien, welche aus einer glykolytierten 6,5 kDa Proteinuntereinheit bestehen und Flp-1 genannt werden (Inouye et al. 1990, Inoue et al. 1998). Fimbrien ermöglichen den Mikroorganismen eine bessere Adhärenz an die Wirtszellen (Rosan et al. 1988) und werden auch als Adhäsine bezeichnet. Sie ermöglichen, dass das Bakterium sich an der mit Speichel überzogenen Zahnoberfläche, an Epithelzellen (Fives-Taylor et al. 1999) und an andere Bakterien, die bereits am Biofilm adhärent sind, anheften kann (Kolenbrander 2000).

Die bakterielle Invasion ist ein komplexer Prozess und abhängig von der Virulenz der Bakterien sowie den Wirtszellen. Nach dem Kontakt des *A. actinomycetemcomitans* mit den gebildeten Mikrovilli der Wirtszelle kommt es zum Eintritt in die Zelle durch Bindung an einen Rezeptor, dem Eindringen und Verlassen der membrangebundenen Vakuolen, der raschen Vermehrung im Zytoplasma, dem Austritt aus der Wirtszelle sowie der Ausbreitung innerhalb der Zellkomplexe (Meyer et al. 1996; 1999). Meist werden die Actinmikrofilamente für die Aufnahme und für die intrazelluläre Fortbewegung genutzt (Oelschlaeger und Kopecko 2000). *A. actinomycetemcomitans* persistiert nicht in den Zellen. Interessante Aspekte sind der schnelle Austritt aus Zellen nach der Invasion, die Fähigkeit von einer Zelle zu anderen zu gelangen und die Kapazität sich ohne Wirtszellen rasch zu teilen (Meyer et al. 1996). Vor Verlassen der Zellen kommt es innerhalb des Zytoplasmas zu massiver Keimvermehrung (Meyer et al. 1996). Die rasche inter- und intrazelluläre Ausbreitung von *A. actinomycetemcomitans* ist im Gegensatz zu der anderer Mikroorganismen nicht actinabhängig. Intrazellulär wird sie durch die enorm hohen Replikationsraten erklärt, extrazellulär durch Kontakt zu den Mikrotubuli der Wirtszellen (Meyer et al. 1999) und den damit verbundenen Ausbildungen von Protrusionen. Solche mikroskopisch sichtbaren Ausstülpungen der Zellmembranen entstehen durch keiminduzierte Verbindungen zweier aneinander liegender Epithelzellen und Einstülpungen einer Zelle in eine andere. Die Bakterien penetrieren in die Zellen, lagern sich innerhalb an und werden bei Zelllyse frei (Fives-Taylor et al. 1999).

A. actinomycetemcomitans ist in der Lage Leukotoxin (Ltx) zu bilden. Ltx ist ein Mitglied der Familie der RTX (repeats in toxin)-Toxine (Narayanan et al. 2002). Diese werden so genannt, weil sich am c-terminalen Ende ihrer Proteinstruktur die Aminosäuren wiederholen (Henderson et al. 2003). Das Ltx-Operon beinhaltet vier Gene. LtxA ist das aktive Toxin, welches vom LtxC und einem Acylcarrierprotein biologisch durch Azetylierung aktiviert werden muss. LtxB und D sind verantwortlich für den Transport und die Sekretion von LtxA (Lally et al. 1991). Das von *A. actinomycetemcomitans* gebildete LtxA bin-

det entweder an den Nukleinsäuren der Bakterienoberfläche oder befindet sich innerhalb der membranösen Vesikel, welche sich ebenfalls an der Bakteriumoberfläche vorwölben (Kato et al. 2002). Die Reaktion der Zielzellen auf das Toxin ist eine durch mitochondriale Störung ausgelöste Apoptose (Korostoff et al. 2000). Oder der Zelltod erfolgt durch Aktivierung der Caspase 1 (Fine et al. 2006). Ltx wirkt gegen PMNs, Monozyten, B- und T-Lymphozyten (Kurita-Ochiai und Ochiai 1996).

Die Lipopolysaccharide von *A. actinomycetemcomitans* führen zu einer Knochenresorption, indem das Bakterium das Zellstressprotein Chaperonin 60 sezerniert, welches wiederum die Osteoklasten aktiviert (Kirby et al. 1995).

Cytolethal distending toxin (CDT) stellt einen weiteren Virulenzfaktor dar. CDT ist das Produkt dreier Genoperone (cdtA, cdtB, cdtC), welche auch in einer Reihe anderer Bakterienstämme wie *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Helicobacter spp.* und *Haemophilus ducreyi* gefunden wurden (Pickett und Whitehouse 1999). Es wird angenommen, dass cdtA und cdtC den Eintritt von cdtB in die Wirtszellen erleichtert. cdtC kann an der Zellmembran der Wirtszellen andocken und als Rezeptor für cdtB agieren. CdtB tritt dann in den Zellkern ein und schädigt die chromosomale DNA mittels seiner DNase Aktivität. Dies führt zum Stillstand des Zellzykluses in der G2-Phase (Pickett und Whitehouse 1999, Rycke und Oswald 2001, Akifusa et al. 2005). CdtB kann den Verlauf des Zellzykluses der humanen Lymphozyten blockieren (Shenker et al. 2001). Alle drei Proteine zusammen stimulieren humane Monozyten, Zytokine zu produzieren. IL-1 β kann auf diesen Weg ausgeschüttet werden, aber sein Partner Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) nicht (Akifusa et al. 2001). CdtB kann allein den Zellzyklus inhibieren, aber in Kombination mit cdtA und cdtC entfaltet es seine maximale biologische Aktivität (Shenker et al. 2005).

Bei Kontakt von *A. actinomycetemcomitans* mit Epithelzellen der Gingiva wird die Produktion von IL-1 β und IL-8 induziert. Die Fibroblasten der Gingiva reagieren auf *A. actinomycetemcomitans* mit einer Ausschüttung von IL-6 und IL-8, aber nicht von IL-1 β (Uchida et al. 2001). Des weiteren stimuliert dieser Bakterienstamm Makrophagen zur Produktion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Tani et al. 1997).

2.2.2 Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis ist ein nichtbewegliches, obligat anaerobes, gramnegatives Bakterium mit stäbchenförmiger Morphologie. Auf Blutagar bildet es zunächst cremefarbene Kolonien,

welche sich nach 4–8 Tagen vom Rand beginnend in Richtung Zentrum rot bis schwarz einfärben. *P. gingivalis* produziert eine große Anzahl von Enzymen, Proteinen und Stoffwechselendprodukten, die sich aktiv gegen ein breites Spektrum von Wirtsproteinen wendet. Durch verschiedene Mechanismen kann es sich vor der Wirtsabwehr schützen (Holt et al. 1999). *P. gingivalis* zählt zu den Zweit- oder Spätbesiedlern der Mundhöhle und kann sich an permanente Zelllinien, an gingivale Epithelzellen und an orale Streptokokken anheften (Lamont et al. 1992a;b, Weinberg et al. 1997).

2.2.2.1 Virulenzfaktoren

Fimbrien fördern die Adhäsion und Invasion an und in die Zielzellen. Sie unterstützen die Bindung an Speichelbestandteile, an kommensale Bakterien und an zahlreichen Wirtszellen, eingeschlossen Makrophagen, Epithelzellen und Fibroblasten. Ebenso können sie an Hämoglobin und an extrazelluläre Matrixproteine binden (Amano 2003).

Nach Eintritt in die Mundhöhle hat *P. gingivalis* zuerst Kontakt mit Speichel. Inhibitorische Komponenten des Speichels (Fibrinogen, Histatin, Fibronectin) hemmen die Adhärenz, andere wie zum Beispiel PRPs, PRGs und Statherin dienen als Rezeptoren für die Fimbrien des *P. gingivalis* und fördern die Bindung am Hydroxyapatit der Zahnoberfläche (Holt et al. 1999) sowie an anderen Plaquebakterien (*Actinomyces viscosus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*). Dies führt zur Kolonisation (Amano 2003).

Majorfimbrien werden in sechs Typen unterteilt (I–V und Ib). Dabei ist die Adhäsion des Typ II fim-A signifikant größer als die der anderen und kommt gehäuft bei schwerer Parodontitis vor (Amano et al. 2004). Sie aktivieren gingivale Epithelzellen und periphere Blutmonozyten und bewirken eine Ausschüttung von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α (Amano 2003). Minorfimbrien induzieren die Bildung von IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α in Makrophagen und sind ein Faktor für die Knochenresorption (Amano et al. 2004).

P. gingivalis produziert eine große Anzahl hydrolytischer, lipolytischer und proteolytischer Enzyme, die in ihrer Gesamtheit Proteinasen genannt werden. Sie agieren gegen Kollagen, Casein, Gelatin, Fibrin, Immunoglobuline, Komplementfaktoren, Proteinaseinhibitoren, Eisentransportproteine und Plasmaproteine (Holt et al. 1999). Die bekanntesten Proteinasen sind die Cysteinproteinasen (Gingipaine). Sie werden in argininspezifische und lysinspezifische Proteinasen unterteilt. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Zerstörung von parodontalem Weichgewebe und Knochen. Gingipaine werden im Zytoplasma des Bakteriums gebildet und über die äußere Membran abgegeben (Holt et al.

1999). Sie sind in der Lage die vaskuläre Permeabilität herunter zu regulieren und spalten Bradykinin vom höhermolekularem Kininogen. Dies führt zu einem signifikanten Anstieg des gingival fluid flow und erhöht die Nährstoffzufuhr für die Plaquebakterien (Darveau et al. 1997). Durch Chemotaxis werden PMNs angelockt und gelangen in großer Konzentration an die Stätte der potentiellen Gewebe- und Knochenzerstörung (Imamura et al. 1995). Gingipaine unterstützen das Wachstum von *P. gingivalis*, indem sie hemmend auf selektive Wirtsabwehrmechanismen einwirken. Eine der wichtigsten Immunantworten ist die Fähigkeit der PMNs Sauerstoffradikale zu erzeugen, welche bacterizid wirken. *P. gingivalis* ist in der Lage mittels seiner argininspezifischen Proteinase diese PMN Funktion zu unterdrücken (Kadowaki et al. 1994). Mit dem Zelltod der PMNs werden Elastasen, Cathepsine, Gelatinasen und Kollagenasen frei und zerstören das umliegende Gewebe.

Die Invasion der Zielzellen erfolgt vermutlich durch rezeptorvermittelte Endozytose. Die Wirtszellen werden dabei nicht beschädigt (Lantz 1996). *P. gingivalis* kann sich auch replizieren und persistieren in den Epithelzellen. Deshalb wird angenommen, dass eine intrazelluläre Lokalisation das Bakterium mit einem nährstoffreichen "Haus" versorgt und es vor der Wirtsabwehr und Antibiotika schützt. Es dringt in Zellen ein und akkumuliert um den Nucleus (Lantz 1996, Amano 2003).

Der Anstieg der Hämoglobinkonzentration und die erniedrigte Sauerstoffsättigung des Hämoglobin steht mit der Progression einer parodontalen Entzündung in Zusammenhang. Die erhöhte Blutzufuhr im Entzündungsgebiet kann nicht den benötigten Sauerstoff liefern. *P. gingivalis* produziert Hämolysin und ist somit fähig Erythrozyten zu lysieren. Das freiwerdende Eisen nutzt er für sich selbst (Holt et al. 1999).

P. gingivalis besitzt auf seiner Oberfläche Lipopolysaccharide mit zytotoxischer Aktivität. Diese können die Synthese wirtseigener Zytokine und Chemokine induzieren. Verglichen mit Lipopolysacchariden von Enterobakterien ist die Endotoxizität von *P. gingivalis* sehr gering (Darveau et al. 1997)

2.3 Aktivierung und Wirkungsweise proinflammatorischer Zytokine

Die Zytokine spielen in der Pathogenese der Parodontitis eine sehr wichtige Rolle und zeichnen sich durch hohe Effektivität in geringen Konzentrationen, eine vorübergehende flüchtige Produktion und eine Wirkung direkt am Ort ihrer Ausschüttung aus. Sie sind oft selbstregulierend, fähig ihre Ausschüttung autokrin oder parakrin zu induzieren und

haben pleiotrophe Auswirkungen auf zahlreiche Zelltypen (Page und Kornman 1997). Zytokine beeinflussen viele biologische Vorgänge wie Proliferation, Wachstum, Differenzierung, Homöostase, Regeneration, Reparation und Inflammation (Okada und Murakami 1998). Sie aktivieren ihre Zielzellen, indem sie an einen spezifischen Rezeptor binden. Dabei wird ein intrazellulärer second Messenger angeregt, der eine Genregulation bewirkt und in der Folge die Synthese von Proteinen induziert (Birkedal-Hansen 1993). Aktivierete Zellen können zur gleichen Zeit verschiedene Zytokine bilden (Okada und Murakami 1998).

2.3.1 Interleukin-1

IL-1 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches auf die Expression verschiedener Gene, die in Entzündungsvorgängen involviert sind, einwirkt (Graves and Cochran 2003). Es wird von aktivierten Makrophagen, PMN, Lymphozyten, Endothel- und Epithelzellen, gingivalen und desmodontalen Fibroblasten und Knochenzellen synthetisiert. Drei Liganden sind bekannt – IL-1 α , IL-1 β und IL-1ra. Die beiden Ersteren haben eine ähnliche biologische Aktivität. Die Ausschüttung von IL-1 β beträgt das 10–50 fache gegenüber IL-1 α . IL-1ra ist ein Agonist und sendet kein biologisches Signal aus, es wirkt als kompetitiver Inhibitor. Auf den Zelloberflächen befinden sich zwei membrangebundene Rezeptoren – IL-1RI und IL-1RII. Binden die Liganden an IL-1RII, werden keine Effekte ausgelöst. Nur bei Kontakt mit dem Rezeptor IL-1RI erfolgt eine Wirkung auf die Zellen (Graves 1999, Graves und Cochran 2003). IL-1 animiert Endothelzellen zur Expressierung ihrer Adhäsionsmoleküle und bewirkt damit eine Anheftung der Leukozyten, welche durch die Gefäßwand hindurch treten und zum Entzündungsort rekrutiert werden (Gemmell et al. 1997). Auf Keratinozyten, Fibroblasten und Epithelzellen wirkt IL-1 proliferierend (Okada und Murakami 1998). Fibroblasten reagieren mit der Produktion von Prostaglandin E und Matrixmetalloproteinasen. Ersteres führt zu einer Hemmung der Knochenkollagenbildung und fördert die Knochenresorption. Zweiteres induziert einen Abbau des parodontalen Bindegewebes und des Knochens. IL-4, IL-10 und IL-1ra hemmen die Sekretion von IL-1 (Graves und Cochran 2003). Die Progredienz einer Parodontitis erfolgt umso schneller und tiefgreifender, je höher der IL-1-Spiegel ist (Hönig et al. 1989). Eine unkontrollierte IL-1-Produktion, hervorgerufen durch eine Überreaktion der wirtseigenen Immunabwehr, führt umgehend zum Gewebeschaden. Patienten mit einem

genetischen Polymorphismus in der IL-1-Promoterregion sind besonders davon betroffen (Graves und Cochran 2003, Taylor et al. 2004).

2.3.2 Interleukin-6

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin und moduliert sowohl die Entzündungsreaktion als auch die Immunantwort. Es wird von Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, aktivierten Makrophagen und Lymphozyten synthetisiert (Okada und Murakami 1998). Die biologischen Effekte werden durch einen Rezeptor vermittelt. Dieser besteht aus zwei Polypeptidketten (p80 und gp130). IL-6 bindet an p80 und zusammen lagern sich diese an gp130 an und bewirken eine Signalübertragung (Naruishi et al. 1999). IL-6 beteiligt sich an der Differenzierung der B-Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und erhöht den Serumspiegel von IgG um das 120–400 fache. Es führt zu einer Erhöhung der Osteoklastenanzahl und deren Vorläuferzellen, stimuliert damit die Knochenresorption und hemmt die Knochenneubildung (Okada und Murakami 1998).

2.3.3 Interleukin-8

IL-8 zählt sowohl zu der Gruppe der Interleukine als auch zu den Chemokinen, da es PMNs entlang eines Konzentrationsgradienten chemotaktisch anlocken kann. Es wird in die Chemokinsubfamilie Cystein-X-Cystein (CXC) eingeordnet. Zwei Rezeptoren sind bekannt – CXCR-1 und CXCR-2. CXCR-1 besitzt eine hohe Spezifität für IL-8. An CXCR-2 binden auch andere Chemokine (Sfakianakis et al. 2001). IL-8 wird von Monozyten, Lymphozyten, Endothelzellen, gingivalen Fibroblasten und Epithelzellen synthetisiert. Durch subgingivale Mikroorganismen werden PMNs in der parodontalen Tasche sowie Epithelzellen zur Chemokinsekretion angeregt. Es entsteht ein Konzentrationsgefälle zwischen Biofilm und subepithelialen Gefäßen. Entlang dieser Leitschiene werden neue PMNs rekrutiert, welche zahlreiche Entzündungsmediatoren und Enzyme freisetzen, die wiederum zum Knochen- und Attachmentverlust führen (Tonetti et al. 1994). Bei fortgeschrittener Erkrankung werden auch Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen animiert, IL-8 zu sezernieren. Die Leitschiene geht dann verloren. Die biologische Wirkung des Zytokins ist dosisabhängig. Bei niedriger Konzentration wird die Migration von PMNs gefördert. Bei hohen Konzentrationen werden die antibakteriellen Mechanismen der PMNs aktiviert. Somit ist IL-8 an der Aktivierung des unspezifischen Abwehrsystems

beteiligt (Gemmell et al. 2001). IL-1 β und TNF- α erhöhen die Ausschüttung von IL-8 (Luster und Simeonova 1998).

2.3.4 Tumornekrosefaktor- α

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin und wirkt synergetisch zu IL-1. Es wird von Makrophagen, Monozyten, PMNs, Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen und Osteoblasten synthetisiert (Graves und Cochran 2003). Die Lipopolysaccharide der gramnegativen Bakterien dienen dabei als Stimulus. TNF- α interagiert mit zwei spezifischen membrangebundenen Rezeptoren – TNF-R1 und TNF-R2 (Graves 1999). Sie sind in verschiedenen zytoplasmatischen Domänen lokalisiert und aktivieren dadurch verschiedene Signalwege. Der höchste inflammatorische Effekt wird an TNF-R1 erreicht. In ruhenden Makrophagen aktiviert TNF- α die Synthese von IL-1 und Prostaglandin E und bewirkt damit die Initiation von Entzündungsprozessen. Es induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen und die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen, welche zum Abbau des parodontalen Bindegewebes beitragen. TNF- α aktiviert die Osteoklasten und fördert damit die Knochenresorption und hemmt die Knochenneubildung. Es verursacht außerdem die Apoptose von Fibroblasten und induziert damit eine Destruktion von parodontalem Gewebe. Die biologische Aktivität dieses Zytokins entspricht der von IL-1, aber TNF- α agiert in geringerem Ausmaß (Okada und Murakami 1998, Graves und Cochran 2003).

2.4 Oxidativer Stress und Antioxidantien

Als oxidativer Stress wird ein Zustand beschrieben, der durch eine Disbalance zwischen den freien Radikalen in einer Zelle und dem antioxidativen Abwehrsystem hervorgerufen wird und zugunsten der freien Radikalen verschoben ist (Halliwell 1994).

Freie Radikale (reactive oxygen species-ROS) enthalten ungepaarte Elektronen und sind ständig bemüht, Elektronen aus anderen Biomolekülen heraus zu lösen. Dabei wird eine Oxidation ausgelöst, welche eine Schädigung des oxidierten Moleküls zur Folge hat (Chapple 2006).

ROS können exogen durch Zigarettenrauch, Ozon, Asbest, Stickstoffdioxid und ionisierender Strahlung aufgenommen werden (Halliwell 1994). Endogen bilden PMNs und Ma-

krophagen das Superoxidanionradikal, das als antibakterieller Schutz der Immunabwehr dient (Akalin et al. 2005).

Eine direkte Gewebeschädigung ist durch Lipidperoxidation, Proteinoxidation, DNA-Schäden und Inaktivierung von Proteaseinhibitoren möglich. Die Aktivierung der redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 veranlassen eine vermehrte entzündungsfördernde Zytokinfreisetzung und führen dadurch zu einer indirekten Gewebeschädigung (Chapple 2006, Cernelio et al. 2008).

Aktiviert PMNs beinhalten zahlreiche Enzyme und Sauerstoffradikale, um Bakterien zu zerstören. Innerhalb der Leukozytenmembran ist dieses System sehr effektiv. Gelangen die Sauerstoffradikale durch Apoptose der Neutrophilen jedoch in die extrazelluläre Matrix, resultiert ein Gewebeschaden daraus (Chapple 2006). Die Parodontitis als entzündliche Erkrankung wurde mit einer Hyperreaktion der PMNs und damit verbundener gesteigerter Radikalfreisetzung in Verbindung gebracht (Cernelio et al. 2008).

Antioxidantien sind der biologische Gegenpart zu den reaktiven Sauerstoffarten. Sie sind Substrate, die selbst in sehr geringer Konzentration, andere Moleküle vor einer Oxidation schützen können (Chapple 2006, Cernelio et al. 2008).

2.5 Rotwein und sein Bestandteil Resveratrol

2.5.1 Rotwein

Wein wird aus den Trauben der "Edlen Weinrebe" (*Vitis vinifera*) hergestellt. Es existieren ungefähr 15 000 verschiedene Rebsorten. Die Ampelographie beschäftigt sich mit den charakteristischen Merkmalen der Weinreben, welche sich von Sorte zu Sorte teilweise nur sehr subtil unterscheiden. (Soleas et al. 1997b)

Der Weinanbau wird schon seit 6000 Jahren betrieben. Es wird angenommen, dass die Entdeckung der Weinherstellung und die Züchtung der *Vitis vinifera* im Süden des Kaukasus statt fand und von dort südwärts nach Palästina, Syrien, Ägypten und Mesopotamien weitergegeben wurde. Im dritten Jahrtausend v. C. wurde Wein zu sakramentlichen Zwecken in Ägypten benutzt. Es sollte noch 2000 Jahre dauern, ehe er generell konsumiert wurde (Soleas et al. 1997b).

Seit Ende des letzten Jahrhunderts ist Rotwein nicht nur als Getränk in geselliger Runde beliebt, sondern auch in der Medizin interessant geworden. 1979 beschrieben Leger et al. erstmals den Zusammenhang zwischen Weinkonsum und der Mortalität aufgrund

einer KHK, indem sie Untersuchungen aus 18 verschiedenen europäischen und amerikanischen Ländern auswerteten (Leger et al. 1979). 1992 definierten Renaud und de Lorgeril den Begriff French Paradox und erklärten damit ein Phänomen der französischen Bevölkerung. Trotz eines hohen Gehaltes an gesättigten Fettsäuren in der Nahrung, weisen die Franzosen eine niedrigere KHK-Mortalitätsrate als andere westliche Industrieländer auf. Sie führten dies auf den höheren Konsum von Rotwein zurück (Renaud und de Lorgeril 1992). Diese These wurde gestützt durch die MONICA-Studie (MONItoring system for CARDiovascular disease) der WHO, die von 37 europäischen Populationen (entspricht 7 Millionen Männer und Frauen im Alter von 35–64 Jahren) über 10 Jahre Daten gesammelt hat. Dabei wurde zusätzlich festgestellt, dass bei den Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Übergewicht und Rauchen keine Unterschiede zwischen Frankreich und den anderen europäischen Ländern vorhanden sind (Tunstall-Pedoe et al. 1999). Doch Frankreich hat einen viel höheren Weinkonsum (67 l / Kopf / Jahr) als z. B. Großbritannien (12 l / Kopf / Jahr) (Yarnell und Evans 2000). Im Süden Frankreichs, in welchem Alkohol zumeist in Form von Rotwein konsumiert wird, ist die KHK-Mortalitätsrate deutlich niedriger als im Norden, in welchem weniger Rotwein, aber mehr Spirituosen getrunken werden (Tunstall-Pedoe et al. 1999).

Es folgten weitere zahlreiche Forschungsstudien in vielen Bereichen der Medizin.

2.5.1.1 Inhaltsstoffe

Um zu verstehen, warum Rotwein als Mittel zur Vorbeugung von Krankheiten eingesetzt werden kann, ist es wichtig seine Inhaltsstoffe zu kennen.

Durch verschiedene moderne Verfahren wie der Gaschromatographie oder der High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) ist es in den letzten Jahren möglich geworden, selbst geringste Mengen von Stoffen zu analysieren.

Rotwein setzt sich aus 500 verschiedenen Komponenten zusammen, von welchen einige in einer Konzentration von weniger als 10^{-1} bis 10^{-6} mg/l vorkommen. Diese haben als einzelne Komponenten keine Bedeutung, beeinflussen jedoch in ihrer Gesamtheit den Geschmack des Weines.

Die Hauptbestandteile sind Wasser (87 %), Ethanol (10 %), Glycerol (1,1 %), Organische Säuren (0,6 %), Phenole (0,2 %) und Zucker (0,05 %). Die Prozentzahlen gelten für einen roten Tafelwein (Soleas et al. 1997b).

2.5.1.2 Polyphenole

Die Polyphenole des Rotweines haben zahlreiche wichtige Funktionen. Sie bestimmen die Bitterkeit, Adstringenz und Farbe des Weines. Ebenso dienen sie als Schutz vor Umwelteinflüssen.

Die Polyphenole bestehen aus mehreren aromatischen Ringen mit an ihnen gebundenen Hydroxylgruppen und unterscheiden sich durch die Anbindung verschiedener Reste von Zucker, Aminen, organischen Säuren oder Fetten voneinander (Bravo 1998).

Sie kommen in der Schale, in den Steinen und im Fruchtfleisch der Weintrauben vor. Unterteilt werden die Polyphenole in Flavonoide und Nicht-Flavonoide.

Zu den Flavonoiden gehören die Flavonole, Flavanole und Anthocyanidine.

Die Flavonole kommen in glykolysierten Formen (Quercetin, Myricetin, Kämpferol) vor. Ihre Menge ist von der Sonnenlichtexposition, welcher die Weintrauben ausgesetzt waren, abhängig. Flavonole können UV-Licht mit einer Wellenlänge größer als 360 nm absorbieren und somit ihre eigene Produktion anregen.

Die Flavanole (Catechin und Epicatechin) sind bitter und adstringent. Die Mehrheit dieser Monomere kondensieren zu Oligomeren (=Proanthocyanidine) und Polymeren (=Tannine). Je länger der Wein gelagert wird, umso mehr werden Polymere gebildet. Die Bitterkeit nimmt dadurch ab, die Adstringenz bleibt.

Die Anthocyanidine geben dem Rotwein seine Farbe. Die Monomere (Cyanidin, Malvidin) sind sehr instabil und reagieren durch Glykolysierung mit Tanninen zu stabilen Anthocyaninen bzw. pigmentierten Tanninen. Diese Reaktionen gehen mit einem längeren Farberhalt des Rotweines einher.

Die Nicht-Flavonoide (=Phenolsäuren) werden eingeteilt in Hydroxyzimtsäuren, Benzolsäuren, hydrolysierbare Tannine und Stilbene. Als Polyphenole spielen sie im Rotwein eine eher untergeordnete Rolle – außer die Stilbene.

Die Stilbene kommen in Form von *trans*-Resveratrol in den Schalen der Weintrauben vor und sind die Antwort auf fungale Infektionen und UV-Licht. Die kondensierten Oligomere werden Viniferin genannt (Waterhouse 2002).

Die Polyphenolmenge und -zusammensetzung variiert je nach Traubenart, Mazerationprozess und Hefeart während der Gärung. Wird eine Traubenart allein betrachtet, werden die Weinpolyphenole durch Faktoren wie Bodenart, Wetter (Temperatur, Regen, Feuchtigkeit, UV-Licht) und biologische Komponenten (Pilze, Insektizide, Dünger) beeinflusst (Goldberg et al. 2003).

Die wichtigste Ursache, dass Rotwein bedeutend mehr Polyphenole (ca. 200 mg / Glas) enthält als Weißwein (ca. 30 mg / Glas), ist die Herstellungsweise.

Den hellen Trauben für den Weißwein wird lediglich der Saft ausgepresst. Dieser reine Traubensaft wird sofort vergärt.

Die roten und blauen Trauben für den Rotwein hingegen werden mit allen festen Bestandteilen zerdrückt. Diese Maische ruht 7–21 Tage. In dieser Zeit können die Polyphenole aus der Schale und den Kernen in den Traubensaft übertreten (Fuhrman et al. 2001, Waterhouse 2002). Dieses Verfahren dient der Farbgebung und Haltbarmachung des Rotweines und hat den Nebeneffekt, dass sich die Menge an Polyphenolen gegenüber dem Weißwein erhöht (Soleas et al. 1997b).

Werden helle Trauben für Weißwein mitsamt ihrer festen Bestandteile in einer Maische für 18 h gelagert, erhöht sich der Gehalt an Antioxidanzien signifikant und ist vergleichbar mit der des Rotweines (Fuhrman et al. 2001).

2.5.1.3 Gesundheitliche Vorteile

In den letzten Jahren erfuhren die Rotweinpolyphenole viel Aufmerksamkeit in der Prävention und Behandlung von Krankheiten. Ihnen wird aufgrund ihrer hohen antioxidativen Aktivität eine Prävention vieler Erkrankungen nachgesagt.

Vor allem Quercetin und Catechin haben eine hohe Affinität freie Radikale zu binden (Soleas et al. 1997b).

ROS entstehen bei Stoffwechselprozessen (oxidativer Stress) oder werden durch die Umwelt aufgenommen. Als Radikalfänger dient die Hydroxylgruppe, welche ein starker Elektronendonator ist und daher leicht oxidiert (Waterhouse 2002).

Polyphenole vermindern die Oxidation von LDL, erhöhen gleichzeitig das HDL und hemmen die Thrombozytenaggregation. Zusammen mit einer verbesserten Endothelfunktion, welche durch Aktivierung der Endothelinsynthese hervorgerufen wird, kann einer Arteriosklerose vorgebeugt werden. Dies wirkt sich präventiv auf die Vermeidung einer KHK aus (Cordova et al. 2005, Szmítko und Verma 2005, Ruf 2004, Klatsky et al. 2003).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist verantwortlich für die Ausschüttung von Zytokinen. Seine Aktivierung erfolgt durch freie Radikale. Polyphenole wirken supprimierend auf NF- κ B und hemmen dadurch die Synthese von proinflammatorischen Proteinen (Zern und Fernandez 2005, Pervaiz 2003, Wadsworth und Koop 1999).

Eine antikanzerogene Wirkung der Polyphenole wird ebenfalls in zahlreichen Studien beschrieben. Zum einen wird durch die antioxidative Aktivität einer Initiierung von mutagenen Entartungen entgegen gewirkt (Stivala et al. 2001). Desweiteren sind sie in der Lage wachstumshemmend auf Krebszellen zu wirken, indem sie den Zellzyklus, durch Hemmung einzelner Enzyme (Na^+ / K^+ ATPase, Tyrosinkinase, Proteinkinase C u. a.), stoppen können. Die Polyphenole des Rotweines sind auch in der Lage den p53-Level herunter zu regulieren und ebenso ist es ihnen möglich, eine Apoptose in mutagenen Zellen zu induzieren (Soleas et al. 1997b).

Die genannten gesundheitlichen Vorteile ergeben sich bei moderatem Rotweingenuss. Dies bedeutet 150–300 ml / Tag für Männer und 75–150 ml / Tag für Frauen. Diese Mengen erklären sich aus der Definition für einen moderaten Trinker, welcher ein bis zwei Drinks am Tag zu sich nimmt. Dabei wird ein Standarddrink mit 5 oz (Unze) für Wein angegeben, umgerechnet ergeben sich 150 ml. Eine höhere Zufuhr von Rotwein wirkt in negativer Weise und kann zu Leberzirrhose, Pankreatitis, Enzephalopathie, Karzinombildung und Alkoholsucht führen (de Lange und van de Wiel 2004, Szmitko und Verma 2005).

Die Absorption einiger Polyphenole findet im Dünndarm durch passive Diffusion statt. Die Mehrheit der Polyphenole gelangt in den Dickdarm. Sie werden zunächst in kleinere Strukturen zerteilt, dann absorbiert und schließlich zusammen mit ihren Metaboliten in die Leber transportiert. Dort werden sie weiter aufgespalten, in die Gallenwege oder in die Nieren transportiert und schließlich über die Fäces oder den Urin ausgeschieden. Die maximale Plasmakonzentration der meisten Polyphenole ist in 1–2 h erreicht (Bravo 1998).

Niedrige Polyphenol-Plasmakonzentrationen können durch eine schlechte Absorption erklärt werden. Einige Polyphenole sind im Blutplasma als Metaboliten präsent und können eine höhere biologische Aktivität aufweisen als die Originalmoleküle (de Lange und van de Wiel 2004).

Die Präsenz von Ethanol im Rotwein kann die Polyphenolverfügbarkeit durch verbesserte intestinale Absorption erhöhen (Bell et al. 2000) und ruft dadurch einen prooxidativen Effekt hervor (Fuhrman et al. 2001).

2.5.2 Resveratrol

Resveratrol ist ein Polyphenol des Rotweines und wird der Gruppe der Nicht-Flavanoide zugeordnet. Der chemische Name heißt 3, 5, 4'-trihydroxystilbene. Resveratrol besteht aus zwei aromatischen Ringen, die mit einer festen Doppelbindung verknüpft sind. Zwei Hydroxylgruppen sind am ersten Phenolring und eine am zweiten Phenolring angebunden. Die Moleküle des Resveratrol kondensieren zu Oligomeren und Polymeren, welche dann Viniferin genannt werden. Es existieren zwei Resveratrolisomere. Das *trans*-Isomer ist die einzige natürlich vorkommende Form, während das *cis*-Isomer nur durch UV-Strahlung entsteht (Soleas et al. 1997a).

Resveratrol wurde erstmals 1940 aus der Wurzel der weißen Nieswurz (*Veratrum grandiflorum*) isoliert (Takaoka 1940) und später, 1963, aus der Wurzel des Japanischen Staudenknöterichs (*Polygonum cuspidatum*, Ko-jo-kon im Japanischen) extrahiert, einer Pflanze die traditionell in der Japanischen und Chinesischen Medizin angewendet wird und zu den größten Quellen des Resveratrol zählt (Nonomura et al. 1963). 1976 wurde über die Entdeckung von Resveratrol im Weinstock (*Vitis vinifera*) berichtet (Langcake und Pryce 1976). Die erste Erwähnung als Bestandteil im Wein fand durch Sieman und Creasy im Jahre 1992 statt. Damit rückte Resveratrol ins Rampenlicht der Wissenschaft. Mehr als 200 Studien wurden seitdem über dieses Molekül verfasst (Soleas et al. 1997a). Resveratrol wird nur in wenigen Pflanzen gebildet. Neben den oben bereits Genannten gehört der Eukalyptusbaum, die Fichte, die schottische Kiefer, der Orchideenbaum, die Taiwanische Nieswurz, der Erdnussbaum und der Wein (*Vitaceae*) dazu.

In der Weinpflanze kommt Resveratrol in den Wurzeln, im Stock, in den Blättern und in der Traubenschale vor. Im Fruchtfleisch ist es nicht zu finden (Soleas et al. 2001).

Resveratrol ist ein Phytoalexin und gehört zur Klasse der pflanzlichen Antibiotika. Das bedeutet, dass Phytoalexine durch äußere Einflüsse wie Pilzinfektionen, UV-Bestrahlung und Verletzungen synthetisiert werden (Pervaiz 2003).

In gesunden Weintrauben ist Resveratrol und Viniferin nicht vorhanden. Die höchste Menge kommt in den gesunden Arealen vor, welche um die durch Pilzinfektion nekrotisch gewordenen Teile liegen. Dies beweist den protektiven Mechanismus gegen *Botrytis*attacken (Soleas et al. 1997a).

Ein weiterer Beleg dieser These wurde erbracht, indem ein Gentransfer von Erdnüssen auf Tabakpflanzen erfolgte und diese dann resistenter gegen Pilzinfektionen waren als der Wildtyp. Eine Korrelation zwischen der Empfänglichkeit für eine Infektion mit *Botry-*

tis cinereae und der Stilbenekonzentration in den Blättern und Trauben wurde ebenfalls festgestellt. Resistente Weinarten haben eine fünffach höhere Konzentration von Resveratrol als anfällige Sorten (Soleas et al. 2001).

Die biologischen Vorläufer des Resveratrolmoleküls sind p-coumaroyl CoA und malonyl CoA. Die Kondensation von p-coumaroyl CoA mit drei Molekülen malonyl CoA wird mittels einer Aktivierung der Stilbenesynthase ausgelöst. Zusätzlich sind vier Mol CO₂ nötig, um ein Mol Resveratrol zu synthetisieren. Die Stilbenesynthase wird durch UV-Licht oder einem Enzym des *Botrytis cinereae*, der Stilbeneoxidase angeregt (Soleas et al. 2001).

Sechs Stunden nach der Reizaussetzung kann die Enzymaktivierung nachgewiesen werden und erreicht ihren Höhepunkt nach 30 h (Pervaiz 2003).

Wein aus warmen und trockenen Gegenden (Kalifornien, Australien, Spanien, Italien, Südafrika, Südamerika) enthalten eine niedrigere Menge an Resveratrol als Weine aus kälteren und feuchten Gebieten wie Kanada und Frankreich (Soleas et al. 2001). Die Konzentration im Cabernet Sauvignon variiert je nach Lage des Anbaus (Gu et al. 1999). Doch nicht nur die Lage des Anbaus wirkt sich auf die Resveratrolbildung aus, sondern auch die Verweildauer der Traubenschalen in der Maische während der Fermentation. Die Konzentration steigt in den ersten vier Tagen an, bleibt dann auf einem Plateau und fällt nach 14 Tagen wieder ab (Soleas et al. 2001).

Die höchste Menge an Resveratrol – durchschnittlich 7 mg/l – enthält Rotwein. Seine Maische muss 7–21 Tage ruhen, damit die Farbpigmente aus der Schale übertreten können. Die Maische des Roseweines lagert nur 24 h und hat deshalb einen geringeren Gehalt von 2 mg/l Stilbenen. Die niedrigste Konzentration von 0,5 mg/ml wird im Weißwein gemessen, dessen Traubenschalen nicht mit verarbeitet werden (Waterhouse 2002).

2.5.2.1 Gesundheitliche Vorteile

In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass Resveratrol biochemische Vorgänge und pathologische Prozesse unterdrücken kann.

Es hemmt die Initiation und das Wachstum von Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel der Unterdrückung der Enzyme Cyclooxygenase und Protein-kinase C. Resveratrol behindert die Vaskularisierung solider Tumore, führt zur Herabregulierung von Zellzyklusproteinen und damit zum Wachstumsstop, sowie zur Erhöhung der Apoptose entarteter Zellen. Die antioxidative Aktivität des Resveratrol verhindert DNA-

Schäden, die durch freie Radikale verursacht werden können (Ulrich et al. 2005, Baur und Sinclair 2006). Die 4'-OH-Gruppe des *trans*-Resveratrols spielt als Radikalfänger die Hauptrolle (Stivala et al. 2001).

Desweiteren kann Resveratrol KHK vorbeugen, indem es die Thrombozytenaggregation und LDL-Oxidation hemmt, sowie zu einer Vasorelaxation führt. Ein Schutz vor Hirnschäden bei cerebraler Ischämie und vor Virusinfektionen wurde in Studien belegt (Baur und Sinclair 2006).

Zur Vorbeugung und Behandlung einer Parodontitis sind zwei Eigenschaften des Resveratrols besonders wichtig: die antioxidative und die antiinflammatorische Aktivität.

Die Fähigkeit des Resveratrol als Antioxidans zu wirken, demonstrierten 1993 erstmals Frankel und Mitarbeiter. In dieser Studie wurde bewiesen, dass Resveratrol weniger effektiv freie Radikale bindet als einige Flavonoide, aber trotzdem viel wirksamer agiert als *alpha*-Tocopherol (Frankel et al. 1993) und Ascorbinsäure (Soleas et al. 2001).

Rotwein hat durch seine Herstellungsweise eine höhere antioxidative Aktivität als Weißwein und speziell Resveratrol ist ein starker Inhibitor der Produktion reaktiver Sauerstoffarten in Mäusemakrophagen, humanen Monozyten und Neutrophilen (Jang et al. 1999).

Die Aktivierung von PMNs und Makrophagen, welche Zytokine freisetzen und die Synthese proinflammatorischer Eicosanoide initiieren, wird von bakteriellen Lipopolysacchariden, ROS oder der Immunantwort selbst initiiert.

Resveratrol beeinflusst eine Reihe zentraler Metaboliten und Enzymsynthesen der Immunantwort. Es induziert eine Downregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, TNF- α und iNOS, indem deren Transkriptionsfaktor NF- κ B nicht aktiviert wird (Rotondo et al. 1998, Wadsworth und Koop 1999, Pervaiz 2003).

Durch Hemmung von NF- κ B, Cyclooxygenase und IL-1 β wirkt Resveratrol antiinflammatorisch und kann akut und chronisch verursachte Ödeme reduzieren, Osteoarthritis mildern, LPS-verursachte Atemwegserkrankungen hemmen, sowie chronische Krankheiten wie Morbus Chron und Psoriasis lindern (Baur und Sinclair 2006).

2.5.2.2 Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit

Da Resveratrol im menschlichen Körper schnell metabolisiert wird, gibt es Zweifel an seiner biologischen Relevanz.

Die Halbwertszeit beträgt nur 8–14 min. Wird eine i. v. Dosis Resveratrol gegeben, so wird es innerhalb von 30 min an Sulfate gebunden.

Hohe Dosen reinen Resveratrols (0,5–1 mg/kg), das nüchternen Probanden verabreicht wurde, war im humanen Plasma nachweisbar. Bei Gabe von lediglich 0,6–1,8 mg reinen Resveratrols, das entspricht der Menge, die in einem Glas Traubensaft enthalten ist, konnte kein Nachweis im Plasma erbracht werden (Baur und Sinclair 2006).

In der Studie von Vitaglione et al. wurde der Plasmagehalt von freien *trans*-Resveratrol und seinen Metaboliten analysiert. Die Probanden wurden in Gruppen aufgeteilt, welche verschiedene Ernährungsweisen annahmen und unterschiedliche Mengen an Rotwein konsumierten. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde Blut entnommen. Die Erkenntnis war, dass es große interindividuelle Differenzen gab. Bei 14 von 25 Probanden wurde zu keiner Zeit Resveratrol gefunden, bei 11 von 25 Probanden wurde in mindestens einer Serumprobe *trans*-Resveratrol oder ein Metabolit gefunden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Konzentration von *trans*-Resveratrol sehr niedrig ist, mit hoher interindividueller Absorptionsvariabilität und raschem Metabolismus und Clearance. Der protektive Effekt des Rotweins erklärt sich eventuell durch die Gesamtheit der Polyphenole im Rotwein und nicht des Resveratrol allein (Vitaglione et al. 2005).

3 Ziele der Arbeit

Eine protektive Wirkung der mediterranen Kost und des Rotweines gegenüber bestimmten chronischen Erkrankungen wird diskutiert. In dieser in-vitro-Studie sollte der Einfluss von Resveratrol und von Rotwein auf makrophagenähnliche Zellen nach Infektion mit parodontopathogenen Bakterien untersucht werden.

Als makrophagenähnliche Zellen wurde die promonozytäre U 937-Zelllinie ausgewählt, welche vor den Versuchen mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) zur Makrophagenproliferation stimuliert wurde.

Einerseits sollte die Wirkung von Rotwein und dessen Bestandteil Resveratrol auf die Adhärenz und Invasivität der Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* M 5-1-2 bestimmt werden.

Andererseits sollte die Frage beantwortet werden, ob diese Substanzen die Zahl der planktonisch vorkommenden Bakterienanzahl reduzieren können.

Um die Wirkungsunterschiede zu untersuchen, sollten verschiedene Konzentrationen von Resveratrol (1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml) und Rotwein (0,1 %, 1 % und 10 %) angewandt werden und die Untersuchungen 1 h, 6 h und 18 h nach Infektion der Zellen mit den Bakterienstämmen erfolgen.

Ein anderer Aspekt widmete sich der Fragestellung, inwieweit die Freisetzung von Zytokinen aus makrophagenähnlichen Zellen durch Rotwein und Resveratrol nach Infektion mit parodontopathogenen Bakterien moduliert wird.

Die Zytokine spielen als zelluläre Botenstoffe bei parodontalen Entzündungen eine wichtige Rolle, deshalb sollte die Ausschüttung von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α untersucht werden. Dabei war von Interesse, welche Einflüsse Rotwein und Resveratrol, sowie die zu untersuchenden Bakterien, auf die Freisetzung von Zytokinen aus makrophagenähnlichen U 937-Zellen ausüben. Ebenso sollten fördernde oder hemmende Effekte bei der Interaktion zwischen Rotwein und Resveratrol mit den Bakterien in Bezug auf die Induktion der Zytokinfreisetzung festgestellt werden. Die Bestimmung der Konzentrationen der Zytokine zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 6 h und 18 h) nach der Infektion der Zellen sollte für die genauere Einschätzung der Kinetik der Zytokinbildung erfolgen.

Insgesamt sollte diese Arbeit dazu beitragen, Wissen über den Einfluss von Resveratrol und Rotwein auf parodontale Erkrankungen zu erlangen und die keimlimitierende Wirkung zu untersuchen. Weiterhin sollten die immunmodulierenden Effekte von Resveratrol und Rotwein evaluiert werden. Und letztendlich sollte bestimmt werden, ob mögliche Effekte des Rotweins ihren Ursprung im Resveratrol haben.

4 Material und Methoden

4.1 Zelllinie, Zellkultivierung und Bestimmung der Zellzahl

Für die Versuche wurden Zellen der permanenten U 937-Zelllinie verwendet. Diese sind promonozytär und entstammen dem Pleuraerguss eines 37 jährigen Mannes. Der Erguss entwickelte sich aufgrund eines diffusen histiozytären Lymphoms.

Alle Arbeiten mit dieser Zelllinie wurden unter sterilen Bedingungen in der Laminatorbox (Hera Safe Klass 2 Typ H) vorgenommen. RPMI 1640 (GIBCO) plus 8 % iges FCS (GIBCO) diente als Medium. Die Zellkultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen (greiner bio-one, Cellstar) bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 100 % iger relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Hera Filtered, Forma Scientific). Durch Splittung aller 4–5 Tage wurden die Zellen subkultiviert.

Zur Zellzählung wurde aus der Zellkulturflasche 1 ml Zellsuspension in ein Mini Tube (1,5 ml, greiner bio-one, Cellstar) gefüllt und in einem zweiten Mini Tube erfolgte eine Verdünnung von 1:10 mit PBS. Mittels einer Neubauer-Zählkammer mit definiertem Kammervolumen konnten die Zellen unter dem Mikroskop (Carl-Zeiss Jena) gezählt werden. Der Mittelwert aus den 4 x 16 Quadraten wurde mit dem Verdünnungsfaktor (x 10) und dem Kammerfaktor (x 10⁴) multipliziert. Das Ergebnis war die Zellanzahl pro ml. Es wurden daraufhin 5 x 10⁵ Zellen pro ml eingestellt. Wenn eine Verdünnung nötig war, wurde dies mit RPMI 1640 durchgeführt.

4.2 Versuchsansatz mit U 937-Zellen, Bakterienstämmen und Rotwein bzw. Resveratrol

Stimulation der Zellen Die Zellen wurden zur Bildung makrophagenähnlicher Eigenschaften stimuliert. Hierzu wurde Phorbol-Myristat-Azetat (PMA) verwendet, welches die Proteinase C der Zellen aktiviert. Vor der Stimulation erfolgte zunächst eine Zentrifugation der Zellsuspension für 4 min bei 400 g (Centrifuge 5804R, Eppendorf) in einem PP-Testtube (50 ml, greiner bio-one, Cellstar). Der Überstand wurde abgesaugt und

verworfen. Die Zellen wurden mit 40 ml RPMI 1640 resuspendiert. Die mit 4 µl PMA (10 ng/ml, SIGMA) versetzte Zellsuspension wurde auf 36 Wells (1 ½ 24-Wellplatten, greiner bio-one, Cellstar) zu je 1 ml verteilt und für 24 h in den Inkubator gestellt.

Vorbereitung der Bakterienstämme Die verwendeten Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 32277 entstammten der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig. Der Stamm *P. gingivalis* M5-1-2 war ein klinisches Isolat eines Patienten mit einer schweren Form einer chronischen Parodontitis.

Der benötigte parodontopathogene Keim wurde auf eine Schaedlerplatte (Schaedler-Agar mit 8 % igem Schafblut (Oxoid) überimpft. Dies war notwendig, um am nächsten Tag für den Versuch ein exponentielles Wachstum des Keimes vorzufinden. Um eine Vermehrung des *A. actinomycetemcomitans* Y4 herbeizuführen, war es ausreichend die Schaedlerplatten in den CO₂-Inkubator zu stellen. Da *P. gingivalis* strikt anaerob ist, mussten diese Agarplatten zusätzlich in luftdichte Behälter mit Anaero Gen (Oxoid) bebrütet werden. Am nächsten Tag wurde der auf der Schaedlerplatte gewachsene parodontopathogene Keim in 5 ml PBS gelöst und mit dem Spectrometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) auf eine optische Dichte von 0,1 bei 640 nm Wellenlänge eingestellt. Als Referenzwert diente die optische Dichte von PBS.

Rotwein 2 ml eines frisch geöffneten Cabernet Sauvignon (France, Bioanbau) wurden mittels einer Einmalspritze (10 ml, B. Braun) aufgezogen und durch einen Filter (0,2 µm, Minisart sartorius) steril in ein TC-Tube (12 ml, greiner bio-one, Cellstar) gefüllt. Um einen Kontrollwert und drei verschiedene Rotweinkonzentrationen zu erhalten, wurden in Tubes folgende unterschiedliche Mischungen hergestellt:

- I: 1 ml PBS
- II: 10µl Rotwein + 990µl PBS
- III: 100µl Rotwein + 900µl PBS
- IV: 1 ml Rotwein

Es wurden je 8 ml RPMI 1640 und 1 ml PBS (I) bzw. 1 ml Rotwein in entsprechender Konzentration (II, III, IV) gemischt. Von diesen 9 ml wurden 5,85 ml in ein anderes

TC–Tube gefüllt und mit 650 µl Bakteriensuspension für die sechs Versuchswerte versetzt und 2,9 ml wurden mit 325 µl PBS für die drei Kontrollwerte verdünnt. Folgende Konzentrationen wurden geprüft:

- I: kein Rotwein (Kontrollwert)
- II: 0,1 % Rotwein
- III: 1 % Rotwein
- IV: 10 % Rotwein

Resveratrol Tiefgefrorenes Resveratrol (SIGMA) in der Konzentration von 2 µg/µl wurde 1:10 mit Ethanol (100 %, J. T. Baker) verdünnt. Um einen Kontrollwert und drei verschiedene Resveratrolkonzentrationen zu erhalten, wurden in Tubes die dargestellten Mischungen hergestellt:

- I: 5 µl Ethanol
- II: 10 µl Resveratrol + 990 µl Ethanol (davon 5 µl in den Ansatz)
- III: 50 µl Resveratrol + 450 µl Ethanol (davon 5 µl in den Ansatz)
- IV: 5 µl Resveratrol

Pro Reihe wurden 9 ml RPMI 1640 und 5 µl Ethanol (I) bzw. 5 µl Resveratrol in entsprechender Konzentration (II, III, IV) gemischt. Von diesen 9 ml wurden 5,85 ml in ein anderes TC–Tube gefüllt und mit 650 µl Bakteriensuspension für die sechs Versuchswerte versetzt und 2,9 ml wurden mit 325 µl PBS für die drei Kontrollwerte verdünnt. Dadurch wurden folgende Konzentrationsgefälle erreicht:

- I: kein Resveratrol (Kontrollwert)
- II: 1 ng/ml Resveratrol
- III: 10 ng/ml Resveratrol
- IV: 100 ng/ml Resveratrol

Zugabe des Ansatzes zu den U 937-Zellen Nach der Entnahme der 24-Wellplatten aus dem Inkubator, wurde das Medium mit Hilfe von Pipetten abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Das PBS wurde ebenfalls wieder abgesaugt. Das Pipettierschema in Abb. 1 zeigt die Verteilung der jeweiligen Mischungen. In jedes Well wurde 1 ml gefüllt.

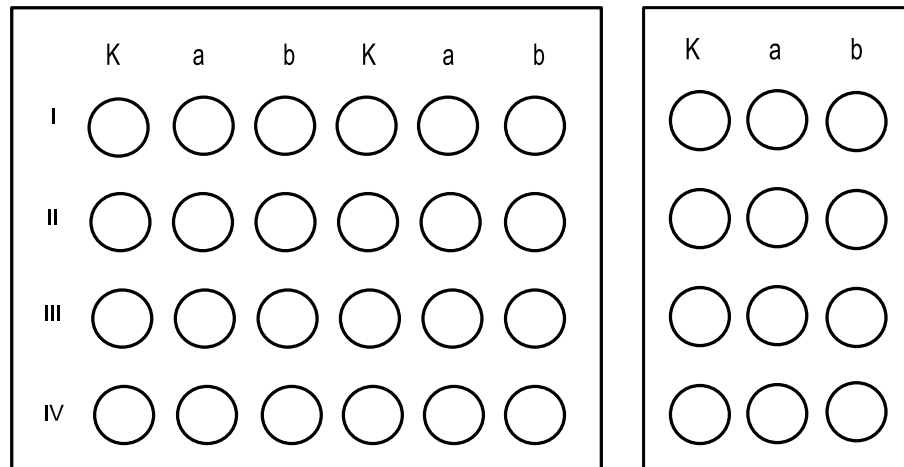


Abb. 1: Pipettierschema der Kontrolllösungen (I K–IV K) und der Bakteriensuspensionen (I a–IV a und I b–IV b) für die Zugabe zu stimulierten U 937-Zellen in 1 ½ 24-Wellplatten

Die Platten wurden nach erfolgter Befüllung wieder in den Inkubator gestellt.

Bestimmung der freien Bakterien Nach einer Stunde wurden aus den Wells Ia–IVa und Ib–IVb (Abb. 1) jeweils 10 µl entnommen und in einem Tube 1:100 mit PBS versetzt. Von dieser Verdünnung wurde nach dem Durchmischen auf dem Vortex (Genie 2, Scientific Industries) wiederum 10 µl abpipettiert und mit Hilfe eines Glasspatels auf eine Schaedlerplatte aufgebracht. Diese Agarplatten wurden in den Inkubator gestellt. Das gleiche Vorgehen erfolgte nach 6 h und 18 h. Nach einigen Tagen konnte die Zahl der koloniebildenden Einheiten ermittelt werden.

Entnahme des Zellkulturüberstandes zur späteren Messung der Zytokine Nach der Bestimmung der freien Bakterien wurden aus den Wells IK–IVK, Ia–IVa und Ib–IVb (Abb. 1) 800 µl abpipettiert und in ein steriles Tube gefüllt. Es schloss sich eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 14 000 U/min (Centrifuge 5415C, Eppendorf) an, damit sich Bakterien und Zellen als Pellet absetzen. Von dieser nun zellfreien Flüssigkeit wurden

wiederum 650 µl entnommen, in ein anderes steriles Tube gefüllt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Das gleiche Vorgehen erfolgte nach 6 h und 18 h.

Bestimmung der Zahl der adhärenenten Bakterien Das verbliebene Medium auf den Zellen wurde abgesaugt und jedes Well zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und auch dieses wieder abgesaugt. Durch Zugabe von 1 ml eiskalten dH_2O (Ampuwa, Fa. Fresenius Kabibi GmbH, Bad Homburg) pro Well wurde eine Lyse der Zellen herbeigeführt. Nach 15 min und kräftiger Durchmischung mittels einer Pipette wurden 100 µl entnommen und in einem Tube mit 900 µl PBS versetzt. Von dieser Verdünnung wurden wiederum 10 µl abpipettiert und auf einer Schaedlerplatte ausgestrichen. Das gleiche Vorgehen erfolgte nach 6 h und 18 h. Die Inkubation und Auszählung der koloniebildenden Einheiten erfolgte wie bereits beschrieben.

4.3 Messung der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α

Für den Nachweis der Interleukine (IL-1 β , IL-6 und IL-8) und des TNF- α wurden ELISA-Tests der Firma Biosource verwendet. Die Tests arbeiten mit dem Sandwichverfahren. Dabei werden zwei Antikörper verwendet, die beide hoch spezifisch und an unterschiedlichen Stellen des nachzuweisenden Antigens binden. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex.

Zunächst wurde eine 96-Well-Mikroplatte (Nunc-Immuno Module, Nunc) mit einer Coating-Antikörper-Lösung beschichtet. Diese Lösung wurde entsprechend der Vorschrift des Herstellers durch Lösen einer entsprechenden Menge des Antikörpers in 10 ml PBS hergestellt. Davon wurden je 100 µl pro Well pipettiert. Die mit Folie abgedeckte Platte wurde für 12–18 h in den Kühlschrank gestellt. Danach wurde die Lösung durch vorsichtiges Ausklopfen entfernt und jedes Well mit 200 µl Blocking-Lösung befüllt. Diese Lösung wurde zuvor aus 1,6 g Rinderserumalbumin BSA (SERVA) und 40 ml PBS hergestellt. Mittels der Blocking-Lösung wird eine unspezifische Bindung der Reaktanten vermieden. Nach Abdeckung mit einer Folie blieb die Platte 2 h bei Raumtemperatur stehen.

Parallel dazu konnten die Proben aufgetaut und die Standardlösung, sowie die Verdünnungsreihe vorbereitet werden. Für die Verdünnungslösung wurde zunächst 4 ml Blocking-Lösung mit 36 ml PBS im Verhältnis 1:10 vermengt. Danach wurden acht Tubes durchnummeriert (1–8). In Tube 1 wurden 450 µl und in die Tubes 2–8 je-

weils 250 µl Verdünnungslösung gefüllt. 50 µl des jeweiligen Zytokinstandards mit einer Konzentration von 10 000 pg/ml wurden in Tube 1 gefüllt und durch mischen und abpipettieren von jeweils 250 µl von Tube 2 bis Tube 7 linear verdünnt. Als Negativprobe erhielt Tube 8 nur Verdünnungslösung.

Durch Ausklopfen der Platte, wurde die Blocking-Lösung entfernt und jedes Well zweimal mit je 200 µl T-TBS (SIGMA) und anschließend noch einmal mit 400 µl T-TBS gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde die Flüssigkeit ausgeklopft und zusätzlich durch aufgelegte Papierhandtücher aufgesaugt. Nach erfolgtem Waschvorgang wurde, wie in Abb. 2 dargestellt, die Spalten 1 und 2 jeweils mit 100 µl der Standardverdünnungsreihe befüllt. Dabei erhielt Reihe 1 die höchste Standardkonzentration von 1 000 pg/ml. In die Spalten 3–12 wurden je 100 µl Probenlösung pipettiert, welche vorher auf dem Vortex durchmischt wurden. In alle Wells erfolgte dann die Zugabe von

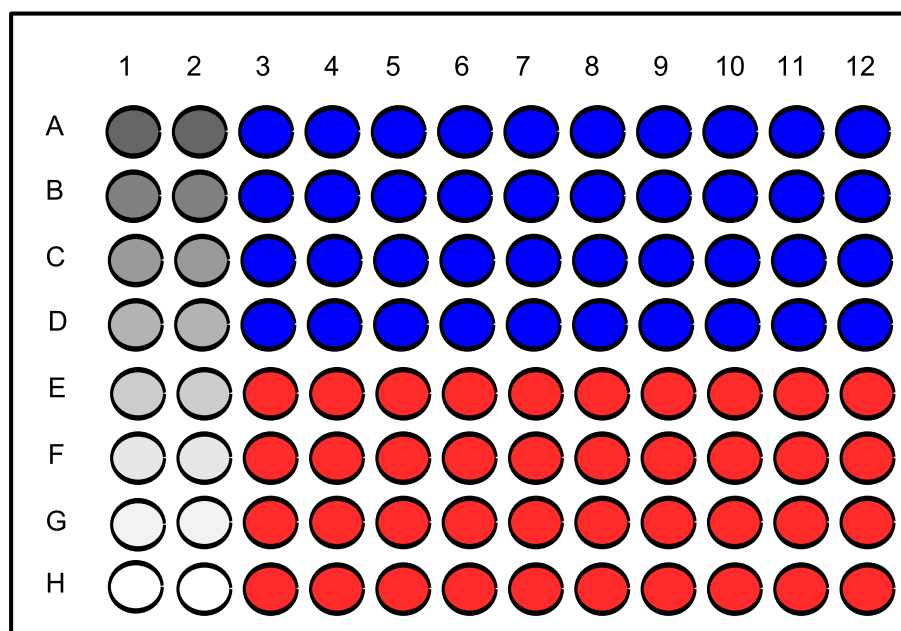


Abb. 2: Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe (Spalte 1–2) und der Probenlösungen (Spalte 3–12). Reihe A–D der Probenlösungen kennzeichnen die aufsteigende Konzentrationsmenge von Resveratrol und Reihe E–H die aufsteigende Konzentrationsmenge von Rotwein.

50 µl Detektion-Antikörper, welcher zuvor mit 5 ml Verdünnungslösung angemischt wurde. Nach Abdeckung mit einer Folie wurde die Platte für 2 h auf einen Rüttler gestellt. Nach diesen zwei Stunden erfolgte das Ausklopfen der Standardreihe, der Proben und des zugefügten Detektion-Anikörpers und die Platte wurde, wie bereits beschrieben, gewaschen.

Nach Vorschrift für das jeweilige Zytokin wurde eine entsprechende Menge Streptavidin - HRP in 10 ml Verdünnungslösung gegeben und 100 µl in jedes Well gefüllt. Nach Abdeckung mit Folie musste die Reaktion 30 min bei Raumtemperatur abgewartet werden. Danach erfolgte wieder ein Waschvorgang wie bereits beschrieben. Nun wurden pro Well 100 µl TMB (Sigma) pipettiert und die Platte 30–45 min unabgedeckt in einen dunklen Raum gestellt. Wenn die Standardreihen konzentrationsabhängig einen deutlichen Blauton aufwiesen, wurde die Reaktion mittels 50 µl 0,5 molarer Schwefelsäure gestoppt. Es erfolgte ein Farbumschwung auf gelb.

Die Messung der Konzentration der Zytokine erfolgte mit dem ELISA-Reader und dem Softwareprogramm easy WIN curve fitting (FIT) bei 450 nm, wobei die Standardkurve für die Berechnung der Zytokinkonzentration in den Proben diente.

4.4 Versuchsansatz mit Rotwein bzw. Resveratrol und Bakterienstämmen, ohne U 937-Zellen

Um zu untersuchen, wie Rotwein bzw. Resveratrol direkt auf die Vermehrung der einzelnen Bakterien wirkt, wurde ein Versuch ohne U 937-Zellen durchgeführt. Die Vorbereitung der Bakterienstämme und Herstellung der Konzentrationen für Rotwein bzw. Resveratrol erfolgte wie bereits beschrieben.

Für den Ansatz mit Rotwein wurden 8 ml RPMI 1640 und 1 ml PBS (I) bzw. 1 ml Rotwein in den verschiedenen Konzentrationen (II=0,1 %, III=1 %, IV=10 %) verwendet. Des weiteren wurden 9 ml RPMI 1640 und 5 µl Ethanol (I) bzw. 5 µl Resveratrol in den verschiedenen Konzentrationen (II=1ng/ml, III=10ng/ml, IV=100ng/ml) für den Ansatz mit Resveratrol angemischt.

Die 9 ml jeder Konzentration wurden in drei TC-Tubes zu je 3 ml aufgeteilt. Diese 3 ml wurden mit 333 µl von der jeweiligen Bakteriensuspension versetzt. Davon wurde je 1 ml für 1 h, 6 h und 18 h in ein Well pipettiert. Benutzt wurden 24-Wellplatten, je eine für 1 h, 6 h und 18 h. Die Platten wurden in den Inkubator mit 5 % CO₂ gestellt. Nach einer Stunde wurden aus der ersten Platte 5 Proben zu je 10 µl aus jedem Well entnommen. Jede Probe wurde mit 990 µl PBS in einem Tube verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde nach dem Durchmischen auf dem Vortex wiederum 10 µl abpipettiert und mit Hilfe eines Glasspatels auf eine Schaedlerplatte aufgebracht. Das gleiche Vorgehen erfolgte nach 6 h

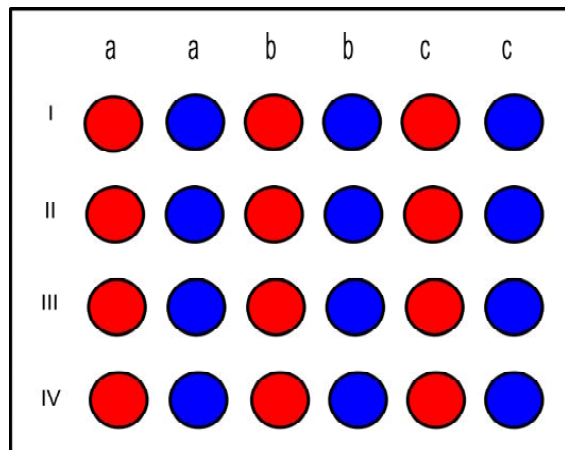


Abb. 3: Pipettierschema für verschiedene Konzentrationen (I–IV) von Rotwein (rot) und Resveratrol (blau). a=*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, b=*Porphyromonas gingivalis* ATCC 32277 und c=*Porphyromonas gingivalis* M 5-1-2

und 18 h. Die Anzucht der Bakterien erfolgte wie bereits beschrieben. Nach einigen Tagen konnten die Bakterienkolonien ausgezählt werden.

4.5 MTT-Nachweis zur Bestimmung der Zytotoxizität

MTT ist ein gelbes Tetrazoliumsalz, welches ausschließlich von lebenden Zellen aufgenommen wird und mittels mitochondrialer Dehydrogenasen in blaues wasserunlösliches Formazan umgewandelt wird. Somit kann eine zytotoxische Wirkung von Bakterien bzw. zugesetzten Substanzen auf Zellen nachgewiesen werden. Der Gehalt an gebildetem Formazan ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in einer homogenen Zellkultur (Ferrari et al. 1990, Mosmann 1983).

In den Versuchen sollte geklärt werden, inwieweit Rotwein und Resveratrol selbst, die Bakterien ohne Zusatz von Rotwein bzw. Resveratrol und die Bakterien in Kombination mit Rotwein oder Resveratrol eine zytoxische Wirkung entfalten.

Zunächst wurden die U 937-Zellen mit PMA stimuliert und je 200 µl der Zellsuspension in eine 96-Wellplatte pipettiert und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Bakteriensuspensionen und die Endkonzentrationen von Rotwein (I=0 %, II=0,1 %, III=1 %, IV=10 %) und Resveratrol (I=0 ng/ml, II=1 ng/ml, III=10 ng/ml, IV=100 ng/ml), wie bereits beschrieben, hergestellt. Nach Entnahme des Mediums aus der Platte wurden folgende Versuchskombinationen erstellt. Dabei wurden je 200 µl in ein Well pipettiert.

Zusatz von Rotwein bzw. Resveratrol Die acht Reihen einer 96-Wellplatte wurden von oben nach unten unterteilt in Resveratrol (I–IV) und Rotwein (I–IV). Um für jede Konzentration vier Werte zu erhalten, wurden die Spalten 1–4 für die erste Stunde, die Spalten 5–8 für die sechste Stunde und die Spalten 9–12 für die achtzehnte Stunde befüllt.

Zusatz von Bakterien Dem Medium RPMI 1640 wurde ein Zehntel einer Bakteriensuspension zugesetzt und diese Lösung wie folgt verteilt: Die ersten drei Spalten wurden mit RPMI 1640 (Kontrollwert) befüllt, dabei war die erste Spalte für den Wert nach 1 h, die zweite Spalte für den nach 6 h und die dritte Spalte für den nach 18 h vorgesehen. Somit konnten je acht Werte eruiert werden. Die Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* M5-I-2 wurden jeweils in die 4.–6. bzw. 7.–9. Spalte pipettiert.

Zusatz von Bakterien und Rotwein bzw. Resveratrol Die verschiedenen Konzentrationen von Rotwein und Resveratrol wurden jeweils 9:1 mit einem der drei Bakterienstämme, *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 32277 oder *P. gingivalis* M5-I-2, versetzt. Die acht Reihen einer 96-Wellplatte wurden von oben nach unten unterteilt in Resveratrol (I–IV) und Rotwein (I–IV). Für jeden Stamm wurden vier Spalten befüllt, um nach 18 h für jede Konzentration vier Werte zu erhalten.

Die Platten wurde abgedeckt in den Inkubator mit 5 % CO₂ für 1 h, 6 h und 18 h gestellt. Nach Ablauf der jeweiligen Versuchszeit wurde jedes Well mit 20 µl MTT-Lösung (SERVA) versetzt und weitere 4 h inkubiert. Dann wurde das Medium ausgeklopft und in jedes Well zunächst 20 µl 3 % ige SDS-Lösung (SIGMA) und zusätzlich 100 µl Isopropanol-0,04-N-HCl pipettiert, um die Reaktion zu stoppen und die Zellen zu lysieren. Nach 30 min Inkubation wurde die colorimetrische Messung im ELISA-Reader mit dem Softwareprogramm easy WIN screening (BASE) bei 562 nm durchgeführt.

4.6 Statistische Auswertung

Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen, wurde der t-Test nach Student angewandt. Er diente zum Vergleich zweier Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten. Es mussten jeweils die Mittelwerte (x und y) und die Standardabweichung (s) ermittelt werden. x und y waren unabhängige Stichproben aus beiden Grundgesamtheiten und konnten einen unterschiedlichen Umfang besitzen. Zur Berechnung wurde

das Programm SPSS Version 13.0 benutzt. Bei pharmazeutisch-medizinischen Tests wird verlangt, dass die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 0.05 % ist, damit sicher ist, dass die beiden verglichenen Versuchsreihen nicht aus der gleichen Verteilung stammen – sie sich also signifikant unterscheiden.

5 Ergebnisse

5.1 U 937-Zellen, Bakterien und Resveratrol bzw. Rotwein

Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) der Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 32277 und *P. gingivalis* M5-1-2 wurden in den folgenden Abbildungen in Bezug auf die unterschiedlichen Konzentrationen von Resveratrol bzw. Rotwein im Vergleich zu Kontrollwerten ohne Resveratrol- bzw. Rotweinzusatz nach 1 h, 6 h und 18 h dargestellt. Gemessen wurde die Anzahl der planktonisch vorkommenden Bakterien, sowie die Summe der adhären-ten und invasiven Bakterien.

Da für jede Konzentration und jeden Zeitpunkt vier bis fünf Werte erhoben wurden, wurde aus diesen der Mittelwert gebildet. Für die Darstellung der KBE wurden Säulendiagramme mit logarithmischer Skalierung verwendet. Die Höhe der Säulen markiert den Mittelwert. Der Fehlerbalken kennzeichnet die Standardabweichung.

Nur die Versuchswerte mit einer Signifikanz von $p=0,05$ bzw. $p=0,01$ werden nachfolgend aufgeführt.

5.1.1 Planktonisch vorkommende Bakterien

5.1.1.1 Resveratrol

Alle verwendeten Bakterienstämme, *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 32277 und *P. gingivalis* M5-1-2, zeigten weder nach 1 h noch nach 6 h und 18 h eine Reduzierung der frei vorkommenden Bakterien. Alle Versuchswerte der einzelnen Konzentrationen entsprachen dem Kontrollwert oder waren nur minimal geringer.

Alle dazugehörigen Diagramme sind in Abb.4 dargestellt. Die einzelnen Versuchswerte sind in Tab. 3 des Tabellenanhangs auf Seite 73 aufgelistet.

5.1.1.2 Rotwein

A. actinomycetemcomitans Y4

Nach 6 h verringerte sich die Anzahl der KBE bei einer Konzentration von 10 % Rotwein um 91 % und nach 18 h um 26 %.

P. gingivalis ATCC 32277

In der 1 % igen Rotweinkonzentration reduzierten sich die planktonisch vorkommenden Bakterien nach 6 h um 89 % und nach 18 h um 99,9 %. Eine 100 % ige Abnahme und somit keine Bakterien konnten bei 10 % igem Rotweinzusatz im 6 h- und 18 h-Intervall nachgewiesen werden.

P. gingivalis M5-1-2

Nach 6 h war eine Reduktion der KBE bei 10 % igem Rotweinzusatz um 91,5 % und nach 18 h um 51 % feststellbar.

Alle dazugehörigen Diagramme sind in Abb.4 dargestellt. Die einzelnen Versuchswerte sind in Tab. 4 des Tabellenanhangs auf Seite 74 aufgelistet.

5.1.2 Adhärente und invasive Bakterien

5.1.2.1 Resveratrol

Die Anzahl der KBE der Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 32277 wiesen keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem Kontrollwert auf.

Der Bakterienstamm *P. gingivalis* M5-1-2 zeigte nach 1 h eine konzentrationsabhängige Verringerung der Adhärenz und Invasivität: 49 % bei 1 ng/ml, 70 % bei 10 ng/ml und 72 % bei 100 ng/ml. Nach einer Inkubationszeit von 6 h betrug die Anzahl der adhärenenten einschließlich der invasiven Bakterien bei 10 ng/ml nur noch 58 % und bei 100 ng/ml 76 % des Kontrollwertes.

Alle dazugehörigen Diagramme sind in Abb.5 dargestellt. Die einzelnen Versuchswerte sind in Tab. 5 des Tabellenanhangs auf Seite 75 aufgelistet.

5 Ergebnisse

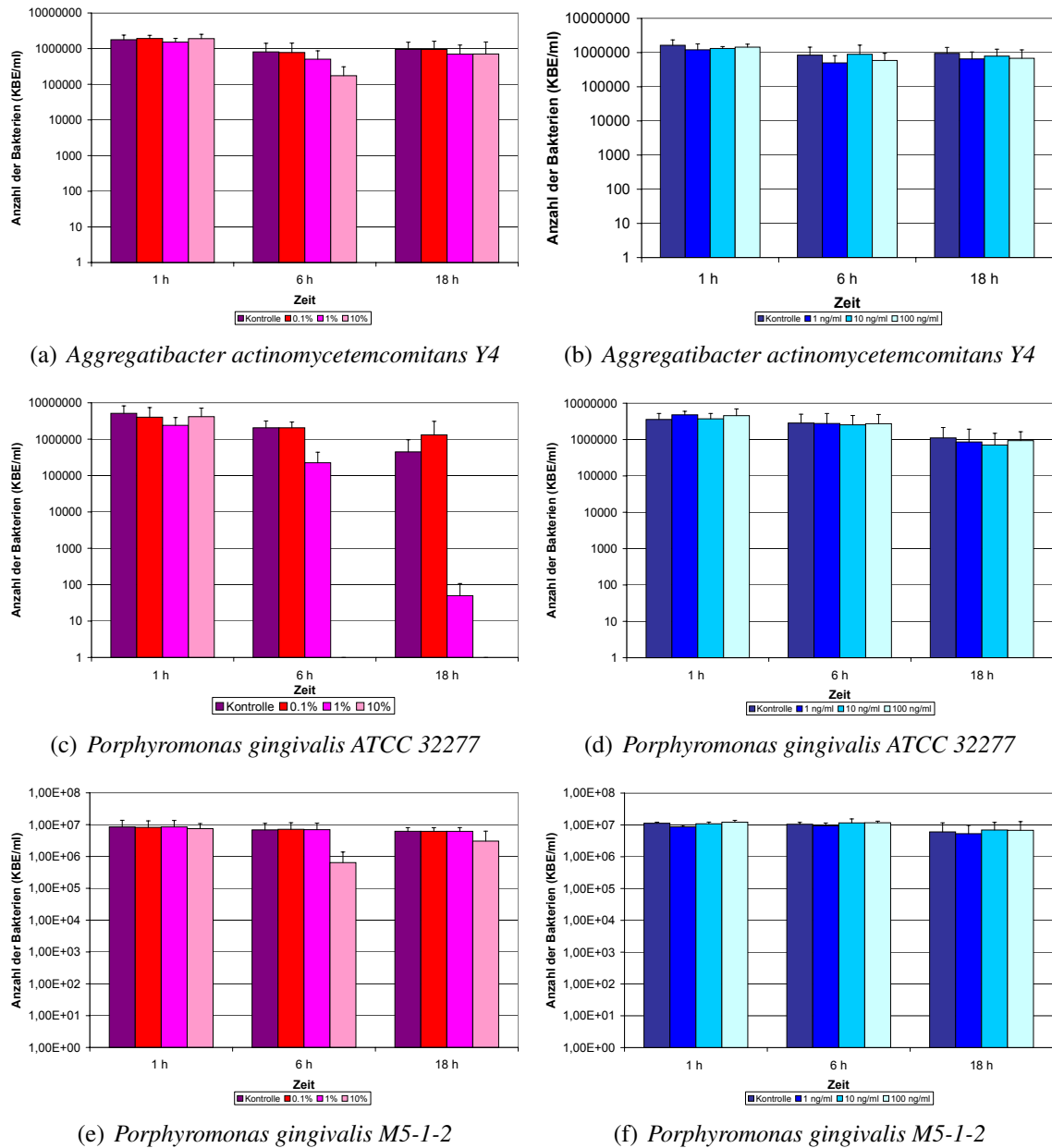


Abb. 4: Linke Spalte: Anzahl der planktonisch vorkommenden Bakterien bei Rotweinzusatz zu den U 937-Zellen. Rechte Spalte: Anzahl der planktonisch vorkommenden Bakterien bei Resveratrolzusatz zu den U 937-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Legenden zeigen die Rotwein- bzw. Resveratrolkonzentrationen. Der Kontrollwert ist ohne Rotwein bzw. Resveratrol erhoben worden.

5.1.2.2 Rotwein

A. actinomycetemcomitans Y4

Die Ergebnisse aller geprüften Konzentrationen erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

P. gingivalis ATCC 32277

Bei 1 % iger Rotweinkonzentration verringerte sich die Adhärenz und Invasivität nach 1 h um 77 %, nach 6 h um 61 % und nach 18 h um 83 %. Eine Reduzierung der Bakterien um 85 % (1 h), 98 % (6 h) und 99,9 % (18 h) wurde bei 10 % igem Rotweinzusatz erreicht.

P. gingivalis M5-1-2

Nach 1 h Inkubationszeit verringerte sich die Anzahl der adhärenenten einschließlich invasiven Bakterien in Bezug auf den Kontrollwert konzentrationsabhängig um 30 % (1% Rotwein) und 64 % (10 % Rotwein). Mit 91 % nach 6 h und 81% nach 18 h erreichte 10 % iger Rotweinzusatz die niedrigsten Werte.

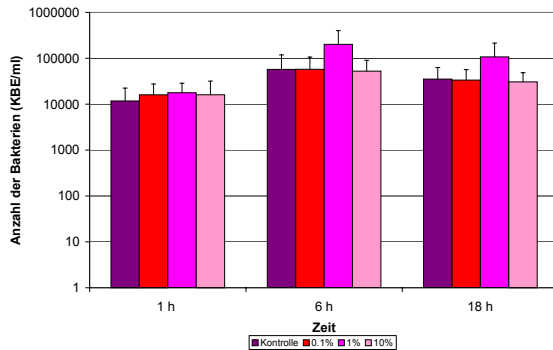
Alle dazugehörigen Diagramme sind in Abb.5 dargestellt. Die einzelnen Versuchswerte sind in Tab. 6 des Tabellenanhangs auf Seite 76 aufgelistet.

5.2 Messung der Zytokine

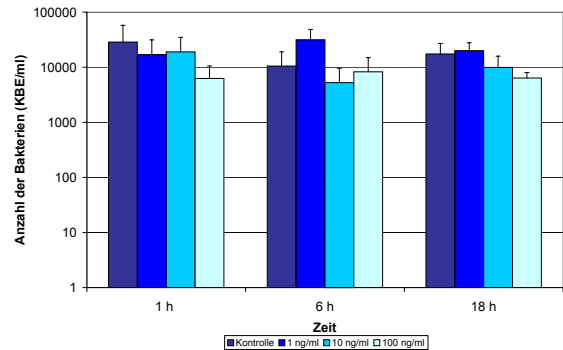
Die grafische Darstellung erfolgte mittels Säulendiagrammen, in denen die Konzentration der Zytokine in Abhängigkeit zu den untersuchten Zeitpunkten (1 h, 6 h und 18 h) aufgeführt sind. Dabei wurde der Einfluss der verschiedenen Resveratrol- bzw. Rotweinkonzentrationen, sowie die Einwirkung der Bakterienstämme, *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 32277 und *P. gingivalis* M5-1-2, auf die Bildung der Zytokine berücksichtigt.

Da für jede Konzentration und jeden Zeitpunkt zwei Proben auf Zytokinbildung untersucht wurden, wurde aus diesen der Mittelwert gebildet, welcher durch die Höhe der Säulen gekennzeichnet ist. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Die Kontrollwerte wurden mittels einer Probe mit den jeweiligen Resveratrol- bzw. Rotweinkonzentrationen erhoben, aber ohne Zugabe der Bakterienstämme. Der äußerste

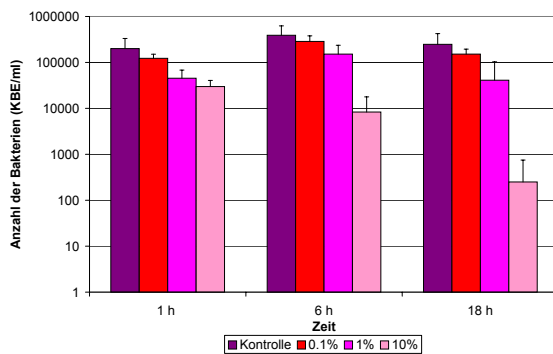
5 Ergebnisse



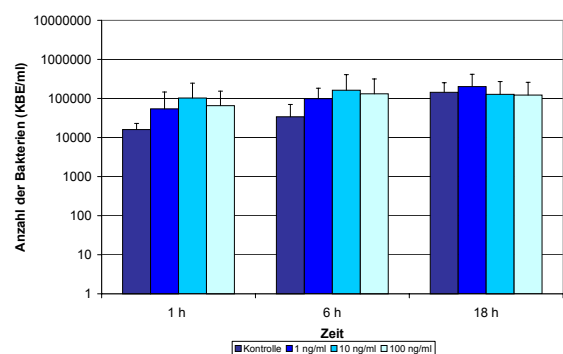
(a) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4



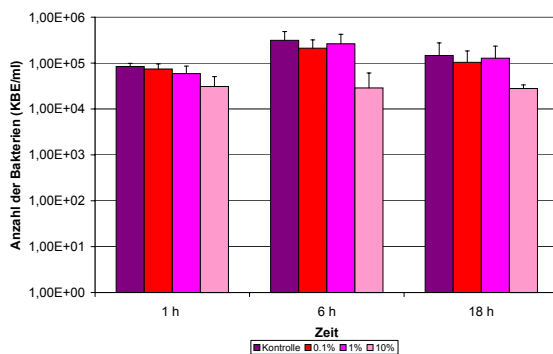
(b) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4



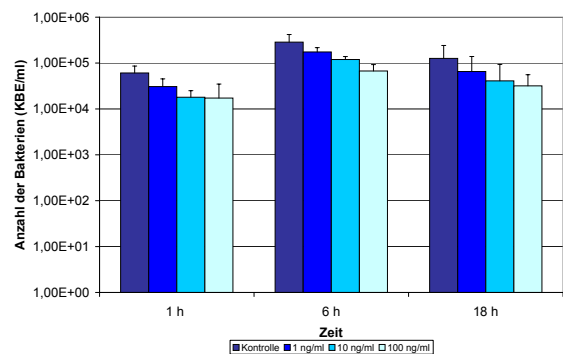
(c) *Porphyromonas gingivalis* ATCC 32277



(d) *Porphyromonas gingivalis* ATCC 32277



(e) *Porphyromonas gingivalis* M5-1-2



(f) *Porphyromonas gingivalis* M5-1-2

Abb. 5: Linke Spalte: Anzahl der adhärennten und invasiven Bakterien bei Rotweinzusatz zu den U 937-Zellen. Rechte Spalte: Anzahl der adhärennten und invasiven Bakterien bei Resveratrolzusatz zu den U 937-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Legenden zeigen die Rotwein- bzw. Resveratrolkonzentrationen. Der Kontrollwert ist ohne Rotwein bzw. Resveratrol erhoben worden.

linke Balken der Kontrollwerte ist ohne Resveratrol- bzw. Rotweinzugabe und stellt die Zytokinausschüttung einer reinen Zellsuspension dar.

Alle Ergebnisse sind in Tabellen im Anhang ab Seite 77 zusammengefasst.

5.2.1 Interleukin-1 β und Interleukin-6

Bei allen durchgeführten Versuchen konnte zu keinem Zeitpunkt weder IL-1 β noch IL-6 nachgewiesen werden.

5.2.2 Interleukin-8

Im Zusammenhang mit *P. gingivalis* ATCC 32277 und *P. gingivalis* M5-I-2 konnte keine IL-8-Bildung festgestellt werden.

Abb. 6 zeigt die IL-8-Konzentrationen bei Zugabe von Resveratrol bzw. Rotwein und dem Bakterienstamm *A. actinomycetemcomitans* Y4.

5.2.2.1 Resveratrol

Zu allen Zeitpunkten liegen die IL-8-Konzentrationen der Kontrollwerte mit Resveratrol unter dem Kontrollwert ohne Resveratrol, wobei nach 1 h und 6 h bei aufsteigender Resveratrolkonzentration auch die IL-8-Ausschüttung zunimmt. Nach 18 h ist die niedrigste IL-8-Konzentration bei 10 ng Resveratrol/ml zu verzeichnen.

Bei Zugabe von *A. actinomycetemcomitans* Y4 konnte nach 1 h nur eine minimale IL-8-Bildung bei 10 ng und 100 ng Resveratrol/ml eruiert werden. Nach 6 h ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der IL-8-Ausschüttung feststellbar, wobei bei 100 ng Resveratrol/ml der niedrigste Wert 1,5 pg/ml zu verzeichnen ist. Nach 18 h ist mit 7,3 pg/ml der höchste Wert für die Probe ohne Resveratrol dargestellt. Die IL-8-Bildung zeigt keine konzentrationsabhängige Abnahme, viel mehr ist feststellbar, dass bei 10 ng Resveratrol/ml die IL-8-Ausschüttung mit 1,8 pg/ml am niedrigsten ist, diese außerdem gegenüber dem Referenzwert um 76 % abnimmt und dem 6 h-Wert entspricht, während für alle anderen Konzentrationen, die IL-8-Ausschüttung nach 18 h noch weiter zugenommen hat.

5.2.2.2 Rotwein

Zu allen Zeitpunkten wird bei den Kontrollwerten mit Zugabe einer 10 % igem Rotweinkonzentration kein IL-8 ausgeschüttet. Die Beimengung von 0,1 % igem Rotweinzusatz führt zur höchsten IL-8-Konzentration, welche sogar den Referenzwert (Probe ohne Rotwein) übersteigt.

Bei Zugabe von *A. actinomycetemcomitans* Y4 konnte nach einer 1 h keine IL-8-Ausschüttung festgestellt werden. Nach 6 h lag die IL-8-Konzentration von 60 pg/ml für 0,1 % igem Rotweinzusatz am höchsten und betrug das 2,2 fache des Referenzwertes ohne Rotwein. Eine minimale IL-8-Ausschüttung bei 1 % Rotwein war eruierbar und bei 10 % Rotwein wurde kein IL-8 nachgewiesen. Nach 18 h war eine Abnahme der IL-8-Konzentration bei 0,1 % igem Rotweinzusatz um 38 % gegenüber dem 6 h-Wert zu verzeichnen, trotzdem liegt auch hier eine 2 fach höhere IL-8-Bildung vor als beim Referenzwert. Die IL-8-Konzentration bei 1 % Rotwein lag 35 % unterhalb des Referenzwertes und bei 10 % Rotwein war keine IL-8-Ausschüttung feststellbar.

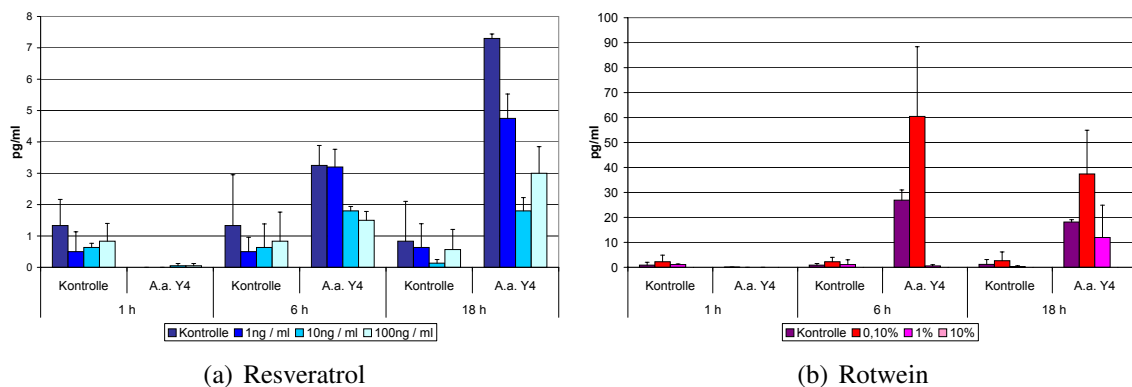


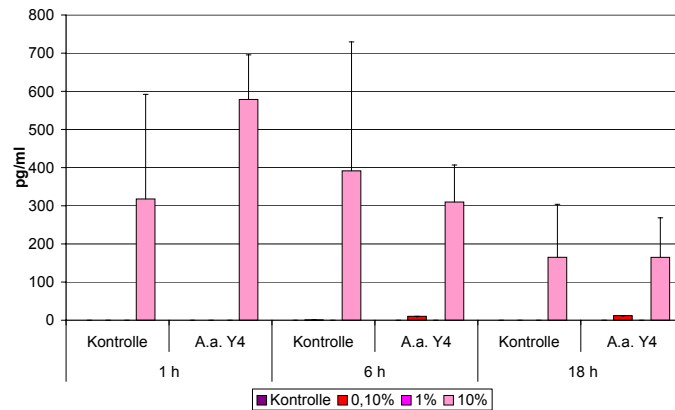
Abb. 6: Abhängigkeit der Interleukin-8-Bildung von verschiedenen Resveratrol- bzw. Rotweinkonzentrationen (Legende) und der Zeit. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Kontrollwerte sind ohne Zugabe von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 erhoben worden.

5.2.3 Tumornekrosefaktor- α

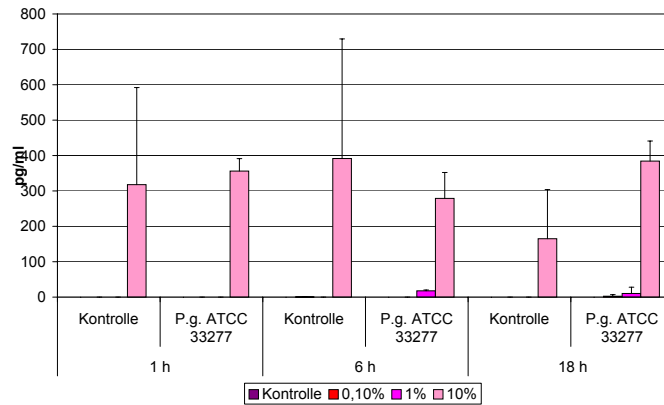
5.2.3.1 Resveratrol

Im Zusammenhang mit Resveratrol konnte bei keinem Bakterienstamm eine TNF- α -Bildung festgestellt werden.

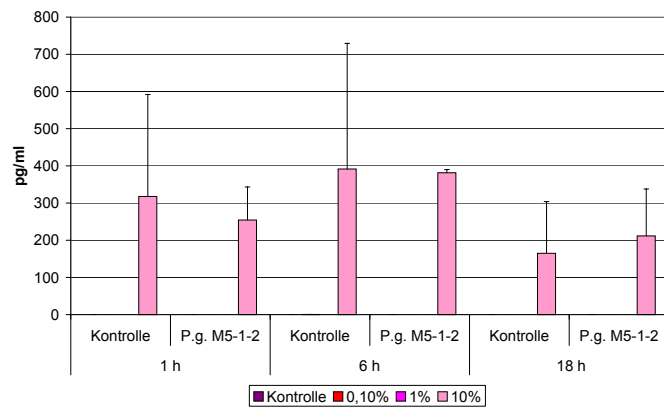
5 Ergebnisse



(a) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4



(b) *Porphyromonas gingivalis* ATCC 32277



(c) *Porphyromonas gingivalis* M5-1-2

Abb. 7: Abhängigkeit der TNF- α -Bildung von der Rotweinkonzentration und der Zeit. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Kontrollwerte sind ohne Zugabe von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 32277 bzw. *Porphyromonas gingivalis* M5-1-2 erhoben worden.

5.2.3.2 Rotwein

Abb. 7 zeigt die TNF- α -Konzentrationen bei Zugabe von Rotwein und den Bakterienstämmen *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 32277 und *P. gingivalis* M5-1-2. Ausschließlich bei 10 % igem Rotweinzusatz war eine hohe TNF- α -Ausschüttung feststellbar.

A. actinomycetemcomitans Y4

Bei einer 10 % igem Rotweinkonzentration wurde mit 579 pg/ml der höchste Wert der TNF- α -Ausschüttung nach einer 1 h erreicht, dieser verringerte sich nach 6 h um 47 % und nach 18 h um 72 %. Nach dem ersten Zeitintervall lag die TNF- α -Bildung 1,5fach höher als der Kontrollwert, nach 6 h um 38 % niedriger und nach 18 h entsprach der Probenwert dem des Kontrollwertes.

P. gingivalis ATCC 32277

Nach 1 h wurde bei einer Konzentration von 10 % Rotwein 356 pg/ml TNF- α gebildet, diese Menge verringerte sich nach 6 h um 22 % und stieg nach 18 h um 37 % wieder an. Die TNF- α -Ausschüttung lag nach 1 h um 12 % höher als der Kontrollwert, nach 6 h um 28 % niedriger und nach 18 h betrug er das 2,3 fache.

P. gingivalis M5-1-2

Mit einer Konzentration von 381 pg/ml war die TNF- α -Bildung bei 10 % igem Rotweinzusatz nach 6 h am Maximum angekommen, überstieg damit um das 1,5 fache den 1 h-Wert und verringerte sich wieder um 45 % nach 18 h. Die Kontrollwerte verhielten sich ähnlich.

5.3 Bakterienstamm und Resveratrol bzw. Rotwein, ohne U 937–Zellen

Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) der Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 32277 und *P. gingivalis* M5-1-2 wurden in den folgenden Abbildungen in Bezug auf die unterschiedlichen Konzentrationen von Resveratrol bzw. Rotwein im Vergleich zu Kontrollwerten ohne Resveratrol-

bzw. Rotweinzusatz und in Abhängigkeit von der Zeit (1 h, 6 h und 18 h) dargestellt. Gemessen wurde die Anzahl der planktonisch vorkommenden Bakterien. Nur die Versuchswerte mit einer Signifikanz von $p=0,05$ bzw. $p=0,01$ werden nachfolgend aufgeführt.

Resveratrol

A. actinomycetemcomitans Y4

Nach 1 h und 6 h war keine signifikante Veränderung der Anzahl planktonisch vorkommender Bakterien ersichtlich. Nach 18 h fiel eine Erhöhung bei 1 ng/ml und 100 ng/ml (118 % und 91 %) gegenüber dem Referenzwert auf.

P. gingivalis ATCC 32277

Um 12 % verringerte sich die Anzahl der KBE nach 1 h Inkubationszeit bei einem Resveratrolzusatz von 100 ng/ml. Eine Erhöhung gegenüber dem Kontrollwert um 54 % konnte nach 6 h bei 1 ng/ml verzeichnet werden, die Werte der Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml reduzierten sich um 70 % und 97 %. Nach 18 h war kein Wachstum im Kontrollansatz und in den Versuchsansätzen feststellbar.

P. gingivalis M5-1-2

Bei einer Konzentration von 100 ng/ml und einer Inkubationszeit von 1 h verringerten sich die planktonisch vorkommenden Bakterien um 13 %. Nach 18 h zeigte sich bei einer Konzentration von 100 ng/ml eine Reduzierung um 51 %. Die Ergebnisse bei 1 ng und 10 ng Resveratrol/ml waren um 21 % bzw. 31 % gegenüber dem Kontrollwert erhöht.

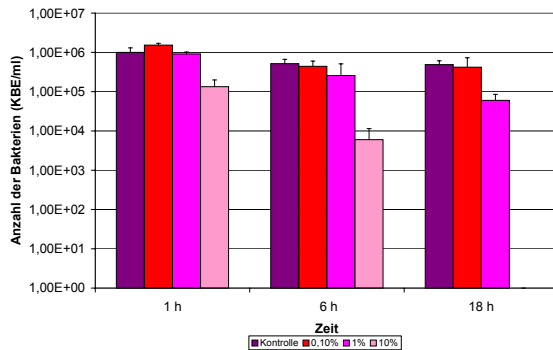
Alle dazugehörigen Diagramme sind in Abb. 8 dargestellt. Die einzelnen Versuchswerte sind in Tab. 1 auf Seite 71 im Tabellenanhang aufgelistet.

Rotwein

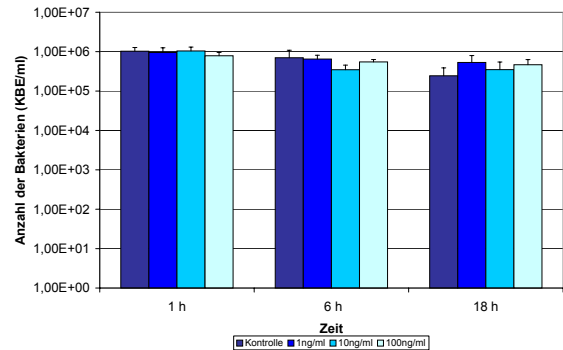
A. actinomycetemcomitans Y4

Nach 1 h stieg die Summe der planktonisch vorkommenden Bakterien bei 0,1 % igem Rotweinzusatz gegenüber dem Kontrollwert um das 1,5fache (53 %). Eine eindeutige Bakterienreduzierung um 87 % wurde bei einer Konzentration von 10 % igem Rotwein

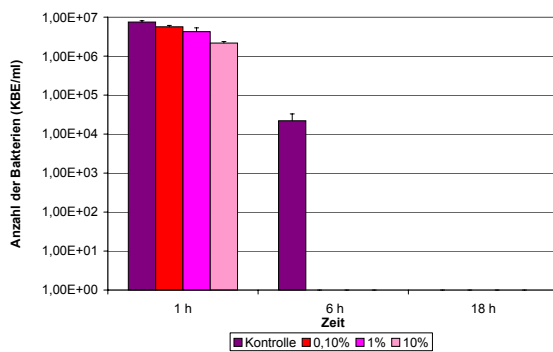
5 Ergebnisse



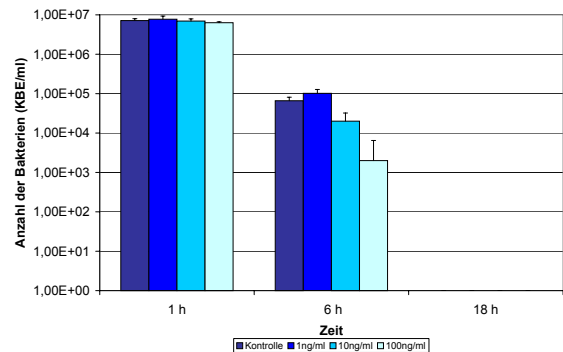
(a) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4



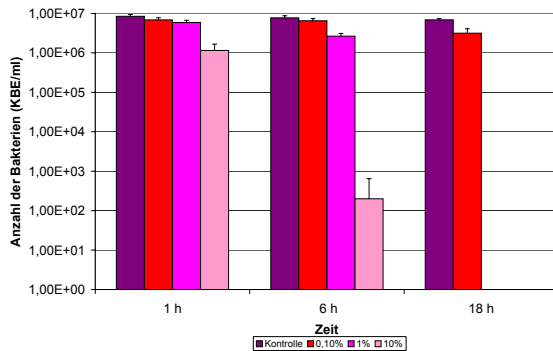
(b) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4



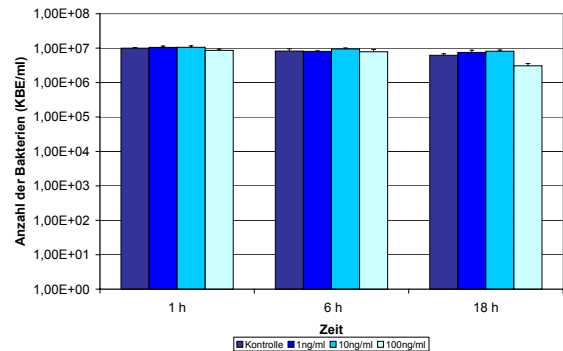
(c) *Porphyromonas gingivalis* ATCC 32277



(d) *Porphyromonas gingivalis* ATCC 32277



(e) *Porphyromonas gingivalis* M5-1-2



(f) *Porphyromonas gingivalis* M5-1-2

Abb. 8: Linke Spalte: Anzahl der planktonisch vorkommenden Bakterien bei Rotweinzusatz ohne U 937-Zellen. Rechte Spalte: Anzahl der planktonisch vorkommenden Bakterien bei Resveratrolzusatz ohne U 937-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Legenden zeigen die Rotwein- bzw. Resveratrolkonzentrationen. Der Kontrollwert ist ohne Rotwein bzw. Resveratrol erhoben worden.

erreicht. Nach 6 h minimierte sich die Bakterienanzahl bei 1 % igem Rotweinzusatz um 50 % und bei 10 % igem Rotweinzusatz sogar um 99 %. Keine Bakterien wurden bei einer Inkubation von 18 h und einer Konzentration von 10 % igem Rotwein nachgewiesen. Eine Reduzierung um 88 % war bei 1 % igem Rotweinzusatz feststellbar.

P. gingivalis ATCC 32277

Eine konzentrationsabhängige Reduktion der Bakterienanzahl wurde nach 1 h erreicht und betrug bei 0,1 % Rotwein 24 %, bei 1 % Rotwein 43 % und bei 10 % Rotwein 71 %. Nach 6 h verringerte sich die Anzahl der KBE in jeder Konzentration um 100 % (kein Bakterienwachstum) gegenüber dem Kontrollwert. Bei einer Inkubationszeit von 18 h waren weder im Kontrollansatz noch in den Versuchsansätzen Bakterien nachzuweisen.

P. gingivalis M5-1-2

Wurde der Bakterienstamm 1 h inkubiert, war bei 0,1 % igem Rotweinzusatz eine Minimierung um 19 %, bei 1 % igem Rotweinzusatz um 31 % und bei 10 % igem Rotweinzusatz sogar um 87 % feststellbar. Nach 6 h wurde der Effekt noch deutlicher. Bei 0,1 % Rotwein wurde eine Reduktion um 15 %, bei 1 % Rotwein um 66 % und bei 10 % Rotwein um 99,9 % erreicht. Nach 18 h wurde bei einer Konzentration von 0,1 % igem Rotwein die Bakterienanzahl um 55 % minimiert, unter Zusatz von 1 % bzw. 10 % Rotwein war ein Bakterienwachstum nicht mehr nachweisbar.

Alle dazugehörigen Diagramme sind in Abb.8 dargestellt. Die einzelnen Versuchswerte sind in Tab. 2 auf Seite 72 im Tabellenanhang aufgelistet.

5.4 MTT-Nachweis zur Bestimmung der Zytotoxizität

Für jede Konzentration und jeden Zeitpunkt bzw. Bakterienstamm wurden vier Werte erhoben, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Für die Darstellung der lebenden Zellen wurden Säulendiagramme mit linearer Skalierung verwendet.

5.4.1 Zusatz von Rotwein bzw. Resveratrol

Der Gehalt an gebildeten Formazan (Extinktion) ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und wird in der folgenden Abb. 9 im Bezug auf die unterschiedlichen Konzentra-

tionen von Rotwein bzw. Resveratrol im Vergleich zu Kontrollwerten ohne Rotwein- bzw. Resveratrolzusatz und in Abhängigkeit von der Zeit (1 h, 6 h und 18 h) dargestellt.

5.4.1.1 Resveratrol

Es konnten keine signifikanten Unterschiede nach 1 h Inkubationszeit eruiert werden. Nach 6 h erhöhte sich der Extinktionswert bei 1 ng/ml Resveratrol um 20,9 % und bei 10 ng/ml Resveratrol um 15,6 %. Eine Verringerung der Anzahl lebender Zellen um 30,1 % gegenüber dem Kontrollwert war nach 18 h Inkubation bei 100 ng/ml Resveratrolzusatz feststellbar.

5.4.1.2 Rotwein

Nach einer Inkubationszeit von 1 h verringerte sich die Anzahl lebender Zellen bei 1 % Rotwein um 25,6 % und bei 10 % Rotwein um 32,4 % gegenüber dem Kontrollwert ohne Rotwein. Auch nach 6 h war eine Extinktionsabnahme bei 1 % igem Rotweinzusatz um 20,4 % und bei 10 % igem Rotweinzusatz um 49,1 % ersichtlich. Dieselbe Tendenz zeigte sich auch nach 18 h Inkubation. Der 1 % ige Wert sank um 26,6 % und der 10 % ige Wert um 34,9 % gegenüber dem Kontrollwert.

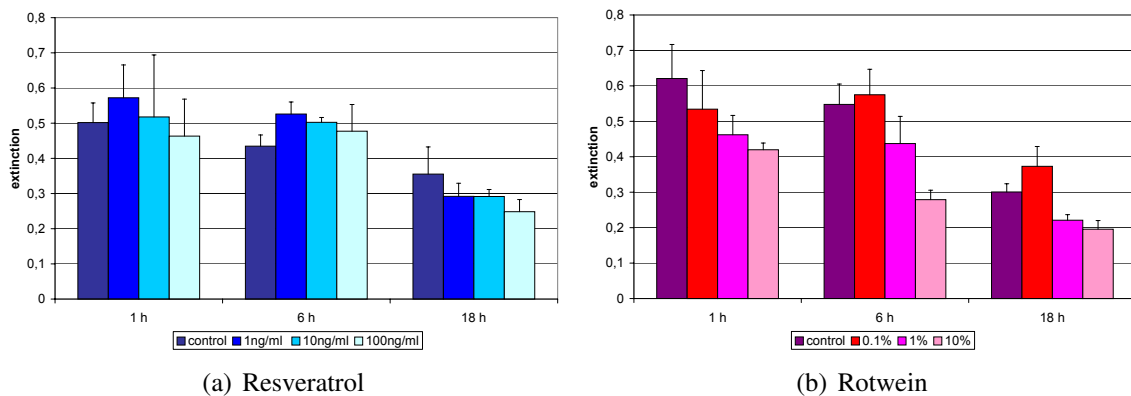


Abb. 9: MTT-Werte in Abhängigkeit von der Resveratrol- bzw. Rotweinkonzentration und der Zeit. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Legenden zeigen die Rotwein- bzw. Resveratrolkonzentrationen. Der Kontrollwert ist ohne Rotwein bzw. Resveratrol erhoben worden.

Zum besseren Vergleich der Zytotoxizität von Rotwein und Resveratrol wurden in der Abb. 10 die Extinktionswerte nach 18 h für die unterschiedlichen Konzentrationen von

Rotwein bzw. Resveratrol verglichen mit dem Kontrollwert ohne Rotwein- bzw. Resveratrolzusatz.

Beim Zusatz von Rotwein wurde bei einer Konzentration von 0,1 % eine Erhöhung des Extinktionswertes um 16 %, bei 1 % igem Rotweinzusatz eine Erniedrigung von 33 % und bei 10 % igem Rotweinzusatz verringerte sich der Wert um 40,6 % gegenüber dem Kontrollwert.

Resveratrol verursachte keine Erhöhung des Extinktionswertes. Es verringerte den Wert bei 1 ng/ml und 10 ng/ml Resveratrol um 15,4 %. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml Resveratrol wurde eine Abnahme von 28,1 % gegenüber dem Kontrollwert festgestellt.

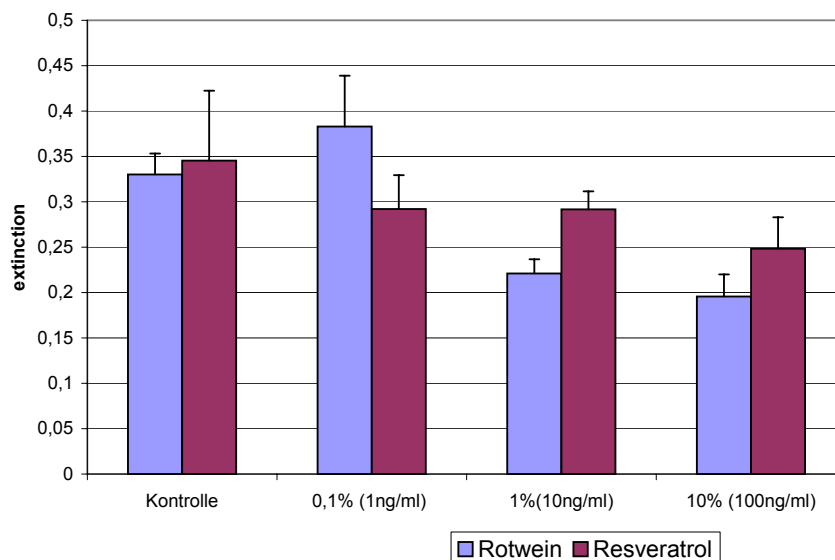


Abb. 10: Vergleich der MTT-Werte verschiedener Resveratrolkonzentrationen mit den entsprechenden Rotweinkonzentrationen nach 18 h Inkubationszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

5.4.2 Zusatz von Bakterienstämmen und Rotwein bzw. Resveratrol

Die Abb. 11 zeigt die Extinktionswerte im Bezug auf die unterschiedlichen Konzentrationen von Rotwein bzw. Resveratrol, welche mit *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 32277 bzw. *P. gingivalis* M5-1-2 versetzt wurden und mit nicht infizierten Kontrollwerten nach einer Inkubationszeit von 18 h verglichen wurden.

5.4.2.1 Resveratrol

A. actinomycetemcomitans Y4

Der Zellmetabolismus veränderte sich bei 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml Resveratrol nicht.

P. gingivalis ATCC

Bei einer Konzentration von 1 ng/ml Resveratrol war eine Erhöhung des Extinktionswertes um 13,9 % feststellbar. Ein Anstieg um 15,1 % wurde bei 10 ng/ml Resveratrol nachgewiesen.

P. gingivalis M5-1-2

Bei einem Zusatz von 1 ng/ml Resveratrol nahmen die lebenden Zellen um 13,4 % ab.

5.4.2.2 Rotwein

A. actinomycetemcomitans Y4

Eine signifikante Verringerung der Anzahl lebender Zellen wurde bei 10 % igem Rotweinzusatz festgestellt. Der Extinktionswert sank um 28% gegenüber dem Kontrollwert.

P. gingivalis ATCC 32277

Eine Extinktionsabnahme erfolgte bei 0,1 % Rotwein um 11,1 % und bei 1 % Rotwein um 34,7 %.

P. gingivalis M5-1-2

Bei einer Rotweinkonzentration von 10 % nahm die Anzahl der lebenden Zellen um 33,5 % ab.

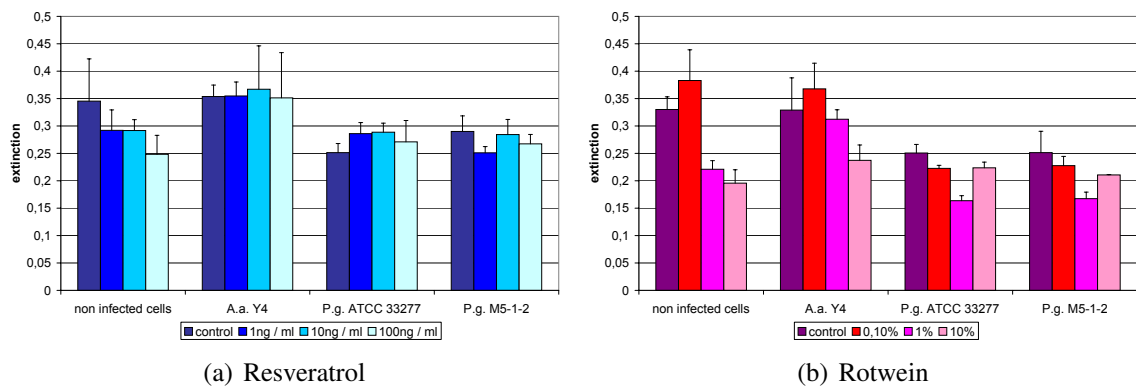


Abb. 11: MTT-Werte in Abhängigkeit von der Resveratrol- bzw. Rotweinkonzentration mit Zugabe von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 32277 bzw. *Porphyromonas gingivalis* M5-1-2 nach 18 h Inkubationszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Kontrollwerte sind ohne Zugabe von Bakterien erhoben worden.

6 Diskussion und Schlussfolgerung

6.1 Methodik

Unsere Untersuchungen erfolgten an U 937-Zellen. Sie sind promonozytär und entstammen einem diffusen histiozytären Lymphom. Diese permanente Zelllinie ermöglicht es, dass alle Versuchsansätze unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden können. Die Ergebnisse sind somit jederzeit reproduzierbar.

Entsprechend der Vorgehensweise von Rovera wurden die U 937-Zellen mittels PMA stimuliert und somit eine Differenzierung zu makrophagenähnlichen Zellen induziert (Rovera et al. 1979). Makrophagen phagozytieren vor allem Mikroorganismen sowie andere unlösliche Substanzen. Sie sind außerdem die wichtigsten Produzenten von Zytokinen in der frühen Phase der Entzündung und können als antigenpräsentierende Zellen die spezifische Immunabwehr aktivieren (Dennison und Dyke 1997, Seymour und Henderson 2001).

Ziel dieser Studie war es, die Interaktion der stimulierten U 937-Zellen mit den parodontopathogenen Bakterien zu untersuchen. Dafür wurden die Zellen als Monolayerschicht in eine Wellplatte eingebracht. Das komplexe Mundhöhlenmilieu können sie indes nicht widerspiegeln.

Die verwendeten U 937-Zellen sind genetisch transformierte Zellen. Dieselbe Versuchsanordnung mit gesunden, nicht neoplastischen Zellen könnte zu anderen Ergebnissen führen.

Die Fähigkeit der parodontopathogenen Mikroorganismen, sich an Zellen anzulagern und in diese einzudringen, stellen entscheidende Schritte im Verlauf einer Parodontitis dar. In unserer Studie verwendeten wir die Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*. Diese haben die höchste parodontopathogene Potenz und können mit der Entstehung einer Parodontitis in direkten Zusammenhang gebracht werden (Fives-Taylor et al. 1999, Holt et al. 1999).

In den letzten Jahren wurde vermehrt nach alternativen Behandlungsmethoden der Parodontitis gesucht. Dabei fanden die Antioxidantien besondere Beachtung. Als Gegenspie-

ler der reaktiven Sauerstoffradikale können sie den Transkriptionsfaktor NF- κ B hemmen und dadurch eine Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine unterdrücken. Dies verhindert eine Gewebeschädigung des Parodonts (Chapple 2006). In zahlreichen Studien wurde die antioxidative und antiinflammatorische Wirkung des Rotweines und seines Bestandteiles Resveratrol bereits beschrieben (Ulrich et al. 2005, Baur und Sinclair 2006). So sollte in unserer Studie untersucht werden, ob Rotwein bzw. Resveratrol zur Vorbeugung und Milderung parodontopathogener Erkrankungen beitragen kann.

Rotwein beinhaltet im Durchschnitt 7 mg Resveratrol/l (Waterhouse 2002). Da dieses Polyphenol sehr schlecht vom Körper absorbiert wird, entschieden wir uns, in unserer Studie die Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml zu untersuchen.

Walle et al. beschrieben die niedrige Absorption des Resveratrol und stellten fest, dass zwei Stunden nach oraler Einnahme von 25 mg *trans*-resveratrol nur 124 ng/ml gebundenes Resveratrol im Plasma messbar war (Walle et al. 2004). Bertelli et al. gaben Ratten 4 ml Rotwein zu trinken. Diese Menge enthielt 26 μ g Resveratrol. Davon waren nach 60 min nur noch 15 ng/ml im Blutplasma nachweisbar. Das entspricht 0,058 % der Anfangsdosis. Nach vier Stunden war bereits kein Resveratrol mehr nachweisbar (Bertelli et al. 1996). In einer anderen Studie wurden 7,5 μ g Resveratrol/kg Körpergewicht oral aufgenommen. Dies entspricht einer Menge von 5,25 g bei einem 70 kg schweren Mann. Die höchste nachweisbare Menge an Resveratrol war 26 nmol (= 60 ng) *trans*-resveratrol/ml Serum (Baur und Sinclair 2006).

Der von uns benutzte Rotwein enthielt 13,5 % Ethanol/0,75 l. Das entspricht 135 g Alkohol/Liter. Die Konzentrationen von 0,1 %, 1 % und 10 % Rotwein/ml in unseren Versuchen sind gleich zu setzen mit 135 μ g Ethanol/l, 1,35 g Ethanol/l und 13,5 g Ethanol/l. Shimazaki et al. bezeichneten die Aufnahme von 15–29,9 g Alkohol/Tag als moderaten Konsum. Darunter liegende Mengen zählen zum leichten Trinkverhalten (Shimazaki et al. 2005).

6.2 Wirkt Rotwein und / oder das Polyphenol Resveratrol bacterizid?

Die Parodontitis wird von Bakterien initiiert, die in der Plaque der Zahnoberfläche kolonisieren und Entzündungsmediatoren in zahlreichen Zellarten stimulieren (Graves 1999). Vor allem zur Behandlung der chronischen Parodontitis wird in der Zahnmedizin eifrig nach alternativen Möglichkeiten gesucht, die parodontopathogenen Bakterien zu bekämpfen.

Unsere Studie ergab, dass bei Zugabe von Resveratrol zu den stimulierten und infizierten U 937-Zellen keine signifikante Bakterienreduktion der planktonisch vorkommenden Bakterien erzielt werden konnte.

Docherty et al. beschrieben, dass Resveratrol in einer Dosis von 200 mg/l bakterizid auf *Propionibacterium acnes* wirkt. Niedrigere Konzentrationen führten zu einer Stase des Bakterienwachstums (Docherty et al. 2007). 60 µg Resveratrol/ml hemmen *Proteus mirabilis* vollständig (Wang et al. 2006). Catechin, ein Polyphenol des Grünen Tees, wirkt in einer Dosis von 1 mg/ml in vitro inhibitorisch auf das Wachstum von *P. gingivalis* (Hirasawa et al. 2002).

Der höchste Resveratrolzusatz in unserer Studie betrug 100 ng/ml und liegt damit weit unterhalb der notwendigen inhibitorischen Konzentration.

Bei Rotweinzusatz war nach 6 h und 18 h Inkubationszeit eine deutliche Abnahme (*A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* M5-1-2) bzw. vollständige Auslöschung (*P. gingivalis* ATCC 32277) der freien Bakterien bei 10% igem Rotweinzusatz zu verzeichnen. *P. gingivalis* ATCC 32277 scheint dabei am sensibelsten auf Rotwein zu reagieren, denn auch bei einer Konzentration von 1 % erfolgte nach 6 h und 18 h eine deutliche Abnahme von 89 % und 99,9 % der planktonisch vorkommenden Bakterien.

Es ist davon auszugehen, dass 10 % Rotwein bakterizid wirkt. Dabei sind die klinischen Isolate *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* M5-1-2 etwas resistenter gegenüber Rotwein als der Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 32277.

Die mittlere inhibitorische Konzentration von Ethanolextrakten aus Pflanzen lag in einer Studie von More et al. zwischen 25 und 0,8 mg/ml und hinderte sowohl *A. actinomycetemcomitans* als auch *P. gingivalis* am Wachstum (More et al. 2008). In unserer Studie lag der Ethanolgehalt von 1% Rotwein bei 1,35 g und bei 10 % Rotwein bei 13,5 g und führte zusammen mit anderen Inhaltsstoffen ebenfalls zur Bakterienstase.

6.3 Verändert Rotwein und / oder das Polyphenol Resveratrol das Phagozytoseverhalten der stimulierten U 937-Zellen?

Die Analyse der adhärenenten und invasiven Bakterien hat ergeben, dass der Zusatz von Resveratrol keine signifikante Veränderung des Adhärenz- und Phagozytoseverhaltens der Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 32277 bewirkte. *P. gingivalis* M5-1-2 verzeichnete jedoch eine konzentrationsabhängige Verringerung der

Adhärenz und Invasivität nach 1 h und 6 h. Nach 18 h Inkubationszeit war dieser Effekt wieder aufgehoben und könnte mit der kurzen Halbwertszeit des Resveratrols erklärt werden.

Iyori et al. beschrieben ebenfalls, dass Resveratrol in der Lage ist, die Phagozytose von Bakterien durch Makrophagen zu hemmen. Dies geschieht durch eine Unterdrückung der Expression von Phagozytoserezeptoren. In ihrer Studie wurden *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* untersucht (Iyori et al. 2008).

Das Phagozytoseverhalten von *P. gingivalis* konnte durch Zugabe von Rotwein, vor allem in den Konzentrationen von 1 % und 10 %, erheblich gestört werden. Die Spezies ATCC 32277 war dabei wieder am empfindlichsten. Bereits nach 1 h wurde bei 1 % igem Rotweinzusatz die Anzahl der adhärenenten und invasiven Bakterien um 77 % reduziert. Nach 18 h und bei einer Konzentration von 10 % igem Rotwein erreichte die Abnahme 99,9 %. Etwas weniger deutlich, aber immer noch signifikant, reagierte die Spezies M5-I-2. Auch hier wurde bei 10 % Rotwein eine deutliche Verringerung der Phagozytose (64 %–91 %) durch die Zellen festgestellt.

Dass Alkohol die Neutrophilen- und Makrophagenfunktion beeinträchtigt und die Bakterienpenetration verringert, wurde bereits von Pitiphat et al. beschrieben. Der moderate Genuss von zwei oder mehr Gläsern Rotwein, ließ das Risiko eine Parodontitis zu entwickeln, um das 1,5 fache ansteigen (Pitiphat et al. 2003). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass Rotwein die Adhärenzmechanismen des *P. gingivalis* hemmt.

Der Bakterienstamm *A. actinomycetemcomitans* Y4 zeigt keine signifikanten Veränderungen bezüglich seiner Adhärenz und Invasivität.

6.4 Können Rotwein, Resveratrol und andere Polyphenole die Interleukinausschüttung unterdrücken?

Polyphenole sind wichtige Antioxidantien, die in der Lage sind reaktive Sauerstoffarten zu neutralisieren und damit unschädlich zu machen. Der oxidative Stress im Gewebe wird dadurch verringert, die Zytokinexpression gehemmt und das Gewebe geschützt (Chapple 2006, Cernelio et al. 2008).

Während unserer Versuche wurde zu keiner Zeit IL-1 β und IL-6 gebildet. Damit weichen unsere Ergebnisse von denen anderer Studien ab.

Mit LPS stimulierte U 937-Zellen, humane periphere Monozyten und Lymphozyten bildeten IL-1 β (Kornman et al. 2007). Aktivierte Mäuseperitonealmakrophagen waren ebenfalls in der Lage IL-1 und IL-6 zu bilden (Feng et al. 2002). Bodet et al. benutzten U 937-Zellen, die mit PMA aktiviert und mit *A. actinomycetemcomitans* bzw. *P. gingivalis* infiziert wurden und daraufhin wurde IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α sezerniert (Bodet et al. 2006). Im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau wurden die Zellen 48 h statt 24 h mit PMA aktiviert. In unserer Studie wurden die Proben für die spätere Zytokinmessung nach 1 h, 6 h und 18 h eingefroren. Bodet et al. taten dies erst nach 24 h. Eventuell ist die Expression der Zytokine IL-1 β und IL-6 erst nach einem längeren Zeitraum als 18 h messbar.

P. gingivalis bewirkte zu keiner Zeit eine IL-8 Ausschüttung aus den U 937-Zellen. Die nicht infizierten Makrophagen sezernierten das Zytokin, jedoch nach Zugabe des Anaerobiers war das Chemokin nicht mehr nachweisbar. Darveau et al. beschrieben, dass gingivale Epithelzellen, nach der Invasion von *P. gingivalis* ihre Fähigkeit, IL-8 zu sezernieren, verloren. Dies wurde auch bei Endothelzellen und gingivalen Fibroblasten beobachtet (Darveau et al. 1997) und wäre eine mögliche Erklärung, warum auch infizierte U 937-Zellen kein IL-8 ausschütten.

Eine weitere Erklärung für unser Ergebnis ist die Erkenntnis, dass die von *P. gingivalis* gebildeten arginin- und lysinspezifischen Cysteinproteasen in der Lage sind, freigesetzte Zytokine proteolytisch abzubauen (Potempa et al. 1997).

Zhang et al. zeigten, dass orale und gingivale Epithelzellen auch nach einer Infektion mit *P. gingivalis* noch IL-8 produzierten. Die Zytokine wurden jedoch nach ihrer Freisetzung von den Proteasen rasch zerstört werden. Der Abbau des IL-8 konnte durch Proteaseinhibitoren deutlich verringert werden und gilt als Beweis, dass die Inaktivierung der Zytokine durch die Proteasen stattfindet (Zhang et al. 1999).

In einer anderen Studie wurden gingivale Epithelzellen mit *A. actinomycetemcomitans* infiziert. Es folgte eine vermehrte Ausschüttung von IL-8. Anschließend wurden denselben Zellen *P. gingivalis* zugesetzt und die Zytokinwerte sanken stark ab. *P. gingivalis* ist demnach auch in der Lage, bereits in Zellen akkumuliertes IL-8 abzubauen (Huang et al. 1998).

Diese Ergebnisse verdeutlichen den starken Einfluss von *P. gingivalis* auf die Zytokine. Dieser induziert eine massive Freisetzung durch seine Fähigkeit zur Persistenz in den Zellen, aber eliminiert die Zytokine auch mit Hilfe seiner Proteasen. Indem der Anaerobier

robier das Immunsystem derart moduliert, sichert er sich das Überleben innerhalb des Wirtsorganismus.

Sfakianakis et al. stimulierten gingivale Epithelzellen mit *A. actinomycetemcomitans* und stellten eine zeit- und dosisabhängige Expression von IL-8 fest. Nach zwei Stunden wurde die Sekretion von IL-8 hoch reguliert und erreichte ihren Maximalwert nach 12–24 h (Sfakianakis et al. 2001). Auch in unseren Versuchen wurde die höchste Chemokinausschüttung nach 18 h dokumentiert.

Der Einfluss von Resveratrol auf die mit *A. actinomycetemcomitans* infizierten U 937-Zellen, hatte eine konzentrationsabhängige Abnahme des Chemokins nach 6 h Inkubationszeit zur Folge. Der niedrigste Zytokinwert wurde bei einer Konzentration von 100 ng Resveratrol/ml erreicht. Die IL-8 Ausschüttung konnte nach 18 h bei einer Dosis von 10 ng Resveratrol/ml am effektivsten gehemmt werden. Die Kontrollproben ohne Resveratrol hatten stets eine höhere Interleukinsekretion. Resveratrol ist also in der Lage, die Bildung dieses Chemokins zu unterdrücken.

Culpitt et al. stellte fest, dass die basale Sekretion von IL-8 der Alveolarmakrophagen von Rauchern und COPD-Kranken ebenso wie die stimulierte IL-8 Produktion von Resveratrol gehemmt wird (Culpitt et al. 2003). Nach Stimulation einer Makrophagenzelllinie mit LPS wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B mittels einer Resveratrolkonzentration von 30 μ M (= 70 ng/ml) unterdrückt (Tsai et al. 1999). Casper et al. beschrieben die Hemmung der durch LPS induzierten Expression von IL-1 β und TNF- α in Endothelzellen und Monozyten mittels Resveratrol (Casper et al. 1999).

Bei Zusatz von Rotwein ist nach 1 h kein IL-8 nachweisbar. Nach 6 h wird die höchste Menge bei 0,1 % iger Rotwein sezerniert und übersteigt den Kontrollwert um das 2,2 fache. Eine minimale Sekretion liegt bei einer Rotweinkonzentration von 1 % vor. Dieselben Ergebnisse zeigen sich auch nach 18 h. 10 % Rotwein führt zu keiner Zeit zu einer Ausschüttung von IL-8.

Die hohe Expression des Chemokins bei einer Konzentration von 0,1 %, könnte daran liegen, dass Rotwein Stress auf die Zellen ausübt und diese zusätzlich stimuliert werden, IL-8 zu bilden. Ist der Rotwein zu 1 % in der Zellsuspension vorhanden, kann die Interleukinausschüttung bereits erheblich gehemmt werden. Und 10 % iger Rotwein ist sogar in der Lage, die IL-8-Bildung vollständig zu unterbinden.

Rotwein unterdrückt in den Konzentrationen 1 % und 10 % in größerem Ausmaße die Zytokinexpression als sein Polyphenol Resveratrol. Da Resveratrol, wenn überhaupt, dann nur in sehr geringen Mengen im humanen Plasma gefunden werden kann, mutmaßte be-

reits Vitaglione et al., dass nicht Resveratrol allein, sondern der gesamte Polyphenol-Pool des Rotweines für dessen protektiven Effekt verantwortlich ist (Vitaglione et al. 2005). Die ebenfalls im Rotwein enthaltenen Flavonoide (Proanthocyanidine, Anthocyanin, Catechin) sowie die Tannine sind auch in der Lage, durch ihr antioxidatives Potential, die Zytokinexpression zu modulieren. Diese Behauptung wird von folgenden Studien gestützt. Bodet et al. untersuchten die Wirkung der Preiselbeere auf die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokine. Preiselbeeren enthalten eine große Menge an Proanthocyanidinen (65,1 %) und eine kleinere Menge an Anthocyanin (0,35 %). Diese beiden Polyphenole sind als Farb- und Bitterstoffe auch Bestandteile des Rotweines. Bodet et al. fanden heraus, dass Preiselbeeren inhibitorisch auf die Bildung von Zytokinen in stimulierten U 937-Zellen wirken. Sie unterdrücken die Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α (Bodet et al. 2006).

Kornman et al. beschrieben den inhibitorischen Effekt auf die IL-1 β Produktion von stimulierten U 937-Zellen durch Extrakte aus Hagebutten, Heidelbeeren, Brombeeren und Weinstöcken, welche Anthocyanine und *trans*-resveratrol enthalten. Die stärkste antioxidative Wirkung hatte die Hagebutte. Sie ist reich an Anthocyaninen. Eine Mischung dieser Extrakte wurde Probanden in Tablettenform über 20 Wochen verabreicht. Nach dieser Zeit konnte eine signifikante Reduzierung der IL-1 β Genexpression in den humanen peripheren Monozyten und Lymphozyten der Testpersonen festgestellt werden (Kornman et al. 2007).

Auch Grüner Tee enthält viele Polyphenole. Die Hauptkomponente Epigallocatechingallate (EGCG) wirkt am effektivsten. Als Antioxidans schützt es vor DNA-Schäden, hemmt eine Oxidation des LDL und reduziert ebenso wie das Resveratrol die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und verhindert damit eine Überproduktion von Zytokinen (Tipoe et al. 2007). Wurde in U 937-Zellen oxidativer Stress induziert, so erwies sich Catechin als stärkster Radikalfänger. Es folgten Epicatechin und Quercetin. Vitamin C hatte die geringste antioxidative Effektivität (Kanupriya et al. 2006). Hirasawa et al. bewiesen in einer klinischen Studie, dass das EGCG des Grünen Tees einer Parodontitis effektiv vorbeugt. Es wurden Catechinstrips in parodontale Taschen eingelegt. In Kombination mit mechanischer Zahnreinigung konnte nach acht Wochen eine reduzierte Taschentiefe festgestellt werden. In der Placebogruppe blieben die Taschentiefen gleich (Hirasawa et al. 2002).

Reich an Polyphenolen (Flavonoide, Tannine) und Vitaminen (Ascorbinsäure, Tocopherol) ist auch die Avocado. Andriamanalijaona et al. belegten in seiner Studie, dass die

Avocado die TGF- β 1 und TGF- β 2 Synthese in humanen Alveolarknochenzellen anregt. Der hemmende Effekt des IL-1 β auf TGF- β wird dabei aufgehoben (Andriamanalijaona et al. 2006).

Resveratrol konnte in einer Studie von Feng et al. dosisabhängig die TNF- α Sekretion von Mäuseperitonealmakrophagen (MPM) unterdrücken. Der größte Effekt wurde durch die höchste Resveratrol-dosis (25 μ mol/ml) ausgelöst (Feng et al. 2002).

Dies können wir mit unserer Studie nicht bestätigen, da TNF- α nur von U 937-Zellen gebildet wurden, die mit 10 % igem Rotweinzusatz inkubiert waren. Das Zytokin war sowohl in den nicht infizierten als auch in den infizierten Proben messbar. Dabei gab es keine Unterschiede zwischen den einzelnen Bakterienstämmen. Die hohe TNF- α Expression könnte ein Hinweis auf die Zytotoxizität von 10 % Rotwein sein. Die Makrophagen starben ab. Die Interleukinbildung wird eingestellt.

Eine Ethanolkonzentration von 0,2 % kann die TNF- α Sekretion in MPM hemmen. Höhere Konzentrationen (0,8 %) führen zur vermehrten Zytokinexpression (Feng et al. 2002). Irie et al. beschrieben, dass ein chronischer Ethanolkonsum den TNF- α Spiegel in der Gingiva von Ratten erhöht. Eine Progredienz der parodontalen Entzündung und der oxidativen Schäden war die Folge (Irie et al. 2008).

6.5 Sind Rotwein, Resveratrol oder andere Polyphenole zytotoxisch?

Die hohe Ausschüttung von TNF- α in den mit 10 % Rotwein versetzten U 937-Zellen ließ uns vermuten, dass diese Konzentration des Rotweines zytotoxisch wirkt.

Ein MTT-Test an nicht infizierten Zellen mit Zugabe von Resveratrol ergab eine Erhöhung des Zellmetabolismus nach 6 h. Alle drei Konzentrationen waren davon betroffen. Dies kann ein Hinweis auf eine Stressreaktion der Zellen auf das Polyphenol sein.

Eine signifikante Reduktion des Stoffwechsels konnte nach 18 h in der höchsten Konzentration (100 ng/ml) festgestellt werden.

Unter dem Einfluss von 1 % und 10 % Rotwein erfolgte ein signifikanter Abfall der Zelllebensfähigkeit nach 1 h, 6 h und 18 h und verdeutlicht die Toxizität von hochprozentigem Rotwein.

Wir gehen davon aus, dass 0,1 % iger Rotweinzusatz eine Stresssituation in den Zellen auslöst und höhere Konzentrationen (vor allem 10 % Rotwein) zytotoxisch wirken.

Die Zugabe der Bakterienstämme *P. gingivalis* ATCC 32277 und *P. gingivalis* M5-1-2 bewirkten eine Abnahme der lebenden Zellen in der Kontrollprobe ohne Resveratrol oder

Rotwein. Bei Zugabe von 1 % Rotwein konnte ein signifikanter Zellverlust festgestellt werden.

A. actinomycetemcomitans Y4 zeigte keinen Einfluss auf den Zellmetabolismus in den Kontrollproben ohne Resveratrol und Rotwein. Jedoch konnte 10 % iger Rotweinzusatz den Zellmetabolismus signifikant behindern.

Von Polyphenolen, als sekundäre Nahrungsmittel bekannt, wird allgemein angenommen, dass sie keine Nebenwirkungen haben.

Preiselbeerextrakt mit einer Dosis von 50 µg/ml plus Proanthocyanidin hatte keine zytotoxische Wirkung auf U 937-Zellen (Bodet et al. 2006). Bisher wurden auch keine negativen Auswirkungen von hohen Mengen Resveratrol beschrieben.

Doch nicht alle Polyphenole können bedenkenlos und unbegrenzt eingenommen werden. Quercetin wirkt in einer Konzentration von mehr als 50 µg/ml zytotoxisch (Kanupriya et al. 2006). Über die Toxizität von Catechin herrschen ambivalente Meinungen. Einerseits stellten Kanupriya et al. fest, dass eine Dosis von 100 µg/ml keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Zellen hat (Kanupriya et al. 2006). Andererseits beschrieben Kou et al. eine Zytotoxizität bei 10 µg/ml konzentriertem Catechin (Kou et al. 2008).

Auch andere Antioxidantien können schädliche Auswirkungen haben. Hohe Dosen Vitamin E und β -Carotin bergen gesundheitliche Risiken. Vitamin A führt überdosiert zu embryotoxischen und teratogenen Effekten. Ascorbinsäure, in großen Mengen eingenommen, kann die Möglichkeit einer Fehlgeburt erhöhen (Carnelio et al. 2008).

Die schädlichen Auswirkungen von Ethanol wurden in mehreren Studien bereits hinreichend beschrieben. Eine chronische hohe Zufuhr von Rotwein kann zu Leberzirrhose, Pankreatitis, Enzephalopathie, Karzinombildung und Alkoholsucht führen (de Lange und van de Wiel 2004, Szmitko und Verma 2005).

In der Hisayama Studie, innerhalb derer 961 Probanden zu ihrem Alkoholkonsum befragt wurden, stellte sich heraus, dass moderate (15–29,9 g) bis starke (≥ 30 g) Trinker im Vergleich mit Nichttrinkern signifikant tiefere Parodontaltaschen vorwiesen. Die Probanden nahmen Sake, Bier, Spirituosen und Whiskey zu sich. Starke Trinker konnten nach Reduktion ihres Alkoholkonsums ihre Mundgesundheit verbessern (Shimazaki et al. 2005).

6.6 Schlussfolgerung

Rotwein besitzt keimabtötende Eigenschaften auf parodontopathogene Bakterien, so wirken Konzentrationen von 1 %–10 % bereits bakterizid. Im Zusammenhang mit Phagozyten tritt dieser Effekt ebenfalls auf, ist jedoch nicht so stark ausgeprägt. Resveratrol als Bestandteil des Rotweins weist keine keimreduzierende Wirkung auf.

Resveratrol und Rotwein wirken immunmodulatorisch, sie waren in der Lage die IL-8 Sekretion zu unterdrücken. Die Akkumulation von PMNs, welche durch Apoptose und damit einhergehende Enzymfreisetzung zur Gewebeschädigung beitragen, könnte somit behindert werden.

Trotz aller positiven Eigenschaften des Rotweins ist eine zytotoxische Wirkung zu beobachten, diese war konzentrationsabhängig feststellbar.

Auf Grund der immunmodulatorischen Eigenschaften stellt Resveratrol einen geeigneten Bestandteil von Mundspüllösungen und dergleichen in der Parodontitistherapie dar. Ein moderater Rotweingenuss könnte sich günstig auf die Verhinderung einer Parodontitis sowie deren Therapie auswirken.

7 Literaturverzeichnis

- Akalin FA, Toklu E, Renda N. 2005. Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol*, 32(3):238–43.
- Akifusa S, Heywood W, Nair SP, Stenbeck G, Henderson B. 2005. Mechanism of internalization of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiology*, 151(Pt 5):1395–402.
- Akifusa S, Poole S, Lewthwaite J, Henderson B, Nair S. 2001. Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell cycle progression and to stimulate human leukocyte cytokine synthesis. *Infect Immun*, 69(9):5925–30.
- Albandar J, Buischi Y, Axelsson P. 1995. Caries lesions and dental restorations as predisposing factors in the progression of periodontal diseases in adolescents. A 3-year longitudinal study. *J Periodontol*, 66(4):249–54.
- Albandar JM, Rams TE. 2002. Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontol 2000*, 29:207–22.
- Amano A. 2003. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 74(1):90–6.
- Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. 2004. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontol Res*, 39(2):136–42.
- Andriamanalijaona R, Benateau H, Barre P, Boumediene K, Labbe D, Compere J, Pujol J. 2006. Effect of interleukin-1 β on transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein-2 expression in human periodontal ligament and alveolar bone cells in culture: modulation by avocado and soybean unsaponifiables. *J Periodontol*, 77(7):1156–66.
- Armitage GC. 2004. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 34:9–21.
- Armitage GC, Research S, of the American Academy of Periodontology TC. 2003. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol*, 74(8):1237–47.
- Axelsson P, Albandar JM, Rams TE. 2002. Prevention and control of periodontal diseases in developing and industrialized nations. *Periodontol 2000*, 29:235–46.
- Baur JA, Sinclair DA. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 5(6):493–506.
- Bell J, Donovan J, Wong R, Waterhouse A, German J, Walzem R, Kasim-Karakas S. 2000. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr*, 71(1):103–8.

- Bertelli A, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement J. 1996. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int J Tissue React*, 18(2-3):67–71.
- Birkedal-Hansen H. 1993. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*, 28(6 Pt 2):500–10.
- Bodet C, Chandad F, Grenier D. 2006. Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *J Dent Res*, 85(3):235–9.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56(11):317–33.
- Carnelio S, Khan S, Rodrigues G. 2008. Definite, probable or dubious: antioxidants trilogy in clinical dentistry. *Br Dent J*, 204(1):29–32.
- Casper R, Quesne M, Rogers I, Shiota T, Jolivet A, Milgrom E, Savouret J. 1999. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol*, 56(4):784–90.
- Chapple ILC. 2006. Oxidative stress, nutrition and neutrogenomics in periodontal health and disease. *Int J Dent Hyg*, 4 Suppl 1:15–21; discussion 50–2.
- Cordova AC, Jackson LSM, Berke-Schlessel DW, Sumpio BE. 2005. The cardiovascular protective effect of red wine. *J Am Coll Surg*, 200(3):428–39.
- Culpitt S, Rogers D, Fenwick P, Shah P, Matos CD, Russell REK, Barnes P, Donnelly L. 2003. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax*, 58(11):942–6.
- Darveau R, Tanner A, Page R. 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000*, 14:12–32.
- de Lange DW, van de Wiel A. 2004. Drink to prevent: review on the cardioprotective mechanisms of alcohol and red wine polyphenols. *Semin Vasc Med*, 4(2):173–86.
- Dennison D, Dyke TV. 1997. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*, 14:54–78.
- Docherty JJ, McEwen HA, Sweet TJ, Bailey E, Booth TD. 2007. Resveratrol inhibition of *Propionibacterium acnes*. *J Antimicrob Chemother*, 59(6):1182–4.
- Drisko C. 2001. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000*, 25:77–88.
- Feng YH, Zou JP, Li XY. 2002. Effects of resveratrol and ethanol on production of pro-inflammatory factors from endotoxin activated murine macrophages. *Acta Pharmacol Sin*, 23(11):1002–6.
- Ferrari M, Fornasiero M, Isetta A. 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*, 131(2):165–72.
- Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. 2006. How we got attached to *Actinobacillus actinomycescomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontol 2000*, 42:114–57.

- Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K, Brissette C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000, 20:136–67.
- Flemmig T. 1999. Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4(1):32–8.
- Frankel E, Waterhouse A, Kinsella J. 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341(8852):1103–4.
- Fuhrman B, Volkova N, Suraski A, Aviram M. 2001. White wine with red wine-like properties: increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. *J Agric Food Chem*, 49(7):3164–8.
- Gemmell E, Carter C, Seymour G. 2001. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol*, 125(1):134–41.
- Gemmell E, Marshall R, Seymour G. 1997. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000, 14:112–43.
- Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. 2003. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem*, 36(1):79–87.
- Graves D. 1999. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis*, 28(3):482–90.
- Graves D, Cochran D. 2003. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74(3):391–401.
- Gu X, Creasy L, Kester A, Zeece M. 1999. Capillary electrophoretic determination of resveratrol in wines. *J Agric Food Chem*, 47(8):3223–7.
- Haffajee A, Socransky S. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000, 5:78–111.
- Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52(8 Pt 1):253–65.
- Heinrich S, Pulverer G. 1959. Zur Ätiologie und Mikrobiologie der Actinomycose. *Zentralblat Bakteriologie Parasitenk Infektionskr Hyg Abt Orig*, 176:91–101.
- Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. 2003. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol*, 57:29–55.
- Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S. 2002. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. *J Periodontal Res*, 37(6):433–8.
- Hönig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F. 1989. Increased interleukin-1 beta (IL-1 beta) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodontal Res*, 24(6):362–7.
- Holt S, Kesavalu L, Walker S, Genco C. 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000, 20:168–238.
- Huang G, Haake S, Kim J, Park N. 1998. Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. *Oral Microbiol Immunol*, 13(5):301–9.

- Imamura T, Potempa J, Pike R, Travis J. 1995. Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 63(5):1999–2003.
- Inoue T, Tanimoto I, Ohta H, Kato K, Murayama Y, Fukui K. 1998. Molecular characterization of low-molecular-weight component protein, Flp, in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Microbiol Immunol*, 42(4):253–8.
- Inouye T, Ohta H, Kokeguchi S, Fukui K, Kato K. 1990. Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett*, 57(1-2):13–7.
- Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, Yamamoto T. 2008. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *J Dent Res*, 87(5):456–60.
- Iyori M, Kataoka H, Shamsul HM, Kiura K, Yasuda M, Nakata T, Hasebe A, ichiro Shibata K. 2008. Resveratrol modulates phagocytosis of bacteria through an NF-kappaB-dependent gene program. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(1):121–7.
- Jang D, Kang B, Ryu S, Chang I, Min K, Kim Y. 1999. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochem Pharmacol*, 57(6):705–12.
- Johnson GK, Hill M. 2004. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol*, 75(2):196–209.
- Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K, Yamamoto K. 1994. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 269(33):21371–8.
- Kanupriya, Dipti P, Sharma S, Sairam M, Ilavazhagan G, Sawhney R, Banerjee P. 2006. Flavonoids protect U-937 macrophages against tert-butylhydroperoxide induced oxidative injury. *Food Chem Toxicol*, 44(7):1024–30.
- Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D, Fine DH. 2002. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol*, 40(4):1181–7.
- Kato S, Kowashi Y, Demuth DR. 2002. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog*, 32(1):1–13.
- Kilian M, Schiott C. 1975. Haemophila and related species in the human oral cavity. *Arch Oral Biol*, 20:791–796.
- Kinane D. 1999. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol*, 4(1):54–64.
- Kinane D, Chestnutt I. 2000. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11(3):356–65.
- Kinane D, Marshall G. 2001. Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J*, 46(1):2–12.
- Kinane D, Podmore M, Murray M, Hodge P, Ebersole J. 2001. Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontol 2000*, 26:54–91.
- Kirby A, Meghji S, Nair S, White P, Reddi K, Nishihara T, Nakashima K, Willis A, Sim R, Wilson M. 1995. The potent bone-resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *J Clin Invest*, 96(3):1185–94.

- Klatsky AL, Friedman GD, Armstrong MA, Kipp H. 2003. Wine, liquor, beer, and mortality. *Am J Epidemiol*, 158(6):585–95.
- Klinger R. 1912. Untersuchungen über menschliche Aktinomykose. *Centralblat Bacteriol*, 62:191–200.
- Kolenbrander P. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol*, 54:413–37.
- Kornman K, Page R, Tonetti M. 1997. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000, 14:33–53.
- Kornman K, Rogus J, Roh-Schmidt H, Krempin D, Davies AJ, Grann K, Randolph RK. 2007. Interleukin-1 genotype-selective inhibition of inflammatory mediators by a botanical: a nutrigenetics proof of concept. *Nutrition*, 23(11-12):844–52.
- Korostoff J, Yamaguchi N, Miller M, Kieba I, Lally E. 2000. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. *Microb Pathog*, 29(5):267–78.
- Kou Y, Inaba H, Kato T, Tagashira M, Honma D, Kanda T, Ohtake Y, Amano A. 2008. Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols. *J Periodontol*, 79(1):174–80.
- Kurita-Ochiai T, Ochiai K. 1996. Immunosuppressive factor from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* down regulates cytokine production. *Infect Immun*, 64(1):50–4.
- Lally E, Golub E, Kieba I, Taichman N, Decker S, Berthold P, Gibson C, Demuth D, Rosenbloom J. 1991. Structure and function of the B and D genes of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin complex. *Microb Pathog*, 11(2):111–21.
- Lamont R, Hersey S, Rosan B. 1992a. Characterization of the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol*, 7(4):193–7.
- Lamont R, Oda D, Persson R, Persson G. 1992b. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol*, 7(6):364–7.
- Langcake P, Pryce R. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*, 9:77–86.
- Lantz M. 1996. New insights into mechanisms of bacterial pathogenesis in periodontitis. *Curr Opin Periodontol*, 3:10–8.
- Leger AS, Cochrane A, Moore F. 1979. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*, 1(8124):1017–20.
- Li J, Helmerhorst E, Leone C, Troxler R, Yaskell T, Haffajee A, Socransky S, Oppenheim F. 2004. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol*, 97(6):1311–8.
- Luster M, Simeonova P. 1998. Asbestos induces inflammatory cytokines in the lung through redox sensitive transcription factors. *Toxicol Lett*, 102-103:271–5.
- Meyer D, Lippmann J, Fives-Taylor P. 1996. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun*, 64(8):2988–97.

- Meyer D, Rose J, Lippmann J, Fives-Taylor P. 1999. Microtubules are associated with intracellular movement and spread of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 67(12):6518–25.
- Moore W, Moore L. 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000, 5:66–77.
- More G, Tshikalange T, Lall N, Botha F, Meyer JJM. 2008. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *J Ethnopharmacol*.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2):55–63.
- Narayanan SK, Nagaraja T, Chengappa M, Stewart GC. 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol*, 84(4):337–56.
- Naruishi K, Takashiba S, Chou H, Arai H, Nishimura F, Murayama Y. 1999. Role of soluble interleukin-6 receptor in inflamed gingiva for binding of interleukin-6 to gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, 34(6):296–300.
- Newman M, Socransky S, Savitt E, Propas D, Crawford A. 1976. Studies of the microbiology of periodontitis. *J Periodontol*, 47:373–379.
- Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A. 1963. Chemical constituents of polygonaceous plants - I. Studies on the components of Ko-jo-kou (*Polygonum cuspidatum*). *Yakugaku Zasshi*, 83:988–990.
- Oelschlaeger T, Kopecko D. 2000. Microtubule dependent invasion pathways of bacteria. *Subcell Biochem*, 33:3–19.
- Okada H, Murakami S. 1998. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9(3):248–66.
- Page R, Kornman K. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000, 14:9–11.
- Papapanou P. 1996. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*, 1(1):1–36.
- Pervaiz S. 2003. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J*, 17(14):1975–85.
- Pickett C, Whitehouse C. 1999. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol*, 7(7):292–7.
- Pitiphat W, Merchant A, Rimm E, Joshipura K. 2003. Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J Dent Res*, 82(7):509–13.
- Potempa J, Pike R, Travis J. 1997. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. *Biol Chem*, 378(3-4):223–30.
- Renaud S, de Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339(8808):1523–6.
- Rosan B, Slots J, Lamont R, Listgarten M, Nelson G. 1988. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Oral Microbiol Immunol*, 3(2):58–63.

- Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotillo D, de Gaetano G, Evangelista V, Cerletti C. 1998. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol*, 123(8):1691–9.
- Rovera G, Santoli D, Damsky C. 1979. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(6):2779–83.
- Ruf JC. 2004. Alcohol, wine and platelet function. *Biol Res*, 37(2):209–15.
- Rycke JD, Oswald E. 2001. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? *FEMS Microbiol Lett*, 203(2):141–8.
- Seymour R, Henderson B. 2001. Pro-inflammatory–anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. *IMA J Math Appl Med Biol*, 18(2):159–92.
- Sfakianakis A, Barr C, Kreutzer D. 2001. Mechanisms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced expression of interleukin-8 in gingival epithelial cells. *J Periodontol*, 72(10):1413–9.
- Shenker B, Hoffmaster R, Zekavat A, Yamaguchi N, Lally E, Demuth D. 2001. Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J Immunol*, 167(1):435–41.
- Shenker BJ, Besack D, McKay T, Pankoski L, Zekavat A, Demuth DR. 2005. Induction of cell cycle arrest in lymphocytes by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin requires three subunits for maximum activity. *J Immunol*, 174(4):2228–34.
- Shimazaki Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Yamashita Y. 2005. Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama Study. *J Periodontol*, 76(9):1534–41.
- Slots J, Ting M. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, 20:82–121.
- Socransky S. 1970. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res*, 49(2):203–22.
- Soleas G, Diamandis E, Goldberg D. 1997a. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*, 30(2):91–113.
- Soleas G, Diamandis E, Goldberg D. 1997b. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal*, 11(5):287–313.
- Soleas G, Diamandis E, Goldberg D. 2001. The world of resveratrol. *Adv Exp Med Biol*, 492:159–82.
- Sreenivasan P, Meyer D, Fives-Taylor P. 1993. Factors influencing the growth and viability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*, 8(6):361–9.
- Stivala L, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni U, Albini A, Prosperi E, Vannini V. 2001. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem*, 276(25):22586–94.
- Szmitko PE, Verma S. 2005. Antiatherogenic potential of red wine: clinician update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(5):H2023–30.

- Takaoka M. 1940. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum*). Faculty Sci Hokkaido Imperial University, 3:1–16.
- Tani Y, Tani M, Kato I. 1997. Extracellular 37-kDa antigenic protein from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in murine macrophages. *J Dent Res*, 76(9):1538–47.
- Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. 2004. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 35:158–82.
- Theilade E. 1986. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 13(10):905–11.
- Tipoe GL, Leung TM, Hung MW, Fung ML. 2007. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 7(2):135–44.
- Tonetti M, Imboden M, Gerber L, Lang N, Laissue J, Mueller C. 1994. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun*, 62(9):4005–14.
- Tsai S, Lin-Shiau S, Lin J. 1999. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF κ B in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol*, 126(3):673–80.
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. 1999. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*, 353(9164):1547–57.
- Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Takemoto T, Sakata M, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M, Kurihara H. 2001. Expression of IL-1 β and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine*, 14(3):152–61.
- Ulrich S, Wolter F, Stein JM. 2005. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol Nutr Food Res*, 49(5):452–61.
- van Winkelhoff A, Slots J. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol 2000*, 20:122–35.
- Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, Fogliano V, Marchelli R. 2005. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res*, 49(5):495–504.
- Wadsworth T, Koop D. 1999. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol*, 57(8):941–9.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, 32(12):1377–82.
- Wang H, Greenwell H. 2001. Surgical periodontal therapy. *Periodontol 2000*, 25:89–99.
- Wang WB, Lai HC, Hsueh PR, Chiou RYY, Lin SB, Liaw SJ. 2006. Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *J Med Microbiol*, 55(Pt 10):1313–21.
- Waterhouse AL. 2002. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci*, 957:21–36.

7 Literaturverzeichnis

- Weinberg A, Belton C, Park Y, Lamont R. 1997. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 65(1):313–6.
- Yarnell J, Evans A. 2000. The Mediterranean diet revisited—towards resolving the (French) paradox. *QJM*, 93(12):783–5.
- Zern TL, Fernandez ML. 2005. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr*, 135(10):2291–4.
- Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan M. 1999. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb Pathog*, 26(5):275–80.

8 Tabellenanhang

8 Tabellenanhang

Tab. 1: Resveratrol ohne U-937-Zellen zu Abb. 8 im Kapitel 5.3, Seite 45
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

(a) <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4								
	a	b	c	d	e	MW	SD	p-Wert
1 h								
Kontrolle	1.290.000	760.000	840.000	960.000	1.280.000	1.026.000	246.941	
1 ng/ml	1.120.000	890.000	1.220.000	1.070.000	460.000	952.000	299.950	
10 ng/ml	710.000	1.060.000	840.000	1.270.000	1.320.000	1.040.000	264.859	
100 ng/ml	960.000	740.000	970.000	640.000	620.000	786.000	169.647	
6 h								
Kontrolle	280.000	450.000	640.000	850.000	1.280.000	700.000	387.750	
1 ng/ml	410.000	750.000	810.000	720.000	550.000	648.000	164.378	
10 ng/ml	330.000	210.000	510.000	350.000	340.000	348.000	106.864	
100 ng/ml	540.000	560.000	460.000	500.000	680.000	548.000	83.187	
18 h								
Kontrolle	210.000	130.000	230.000	490.000	160.000	244.000	143.108	
1 ng/ml	720.000	610.000	250.000	260.000	820.000	532.000	263.572	0.05
10 ng/ml	80.000	480.000	570.000	390.000	230.000	350.000	196.342	
100 ng/ml	530.000	300.000	530.000	670.000	300.000	466.000	161.957	0.05
(b) <i>P. gingivalis</i> ATCC 32277								
	a	b	c	d	e	MW	SD	p-Wert
1 h								
Kontrolle	6.900.000	7.200.000	8.300.000	7.400.000	6.000.000	7.160.000	832.466	
1 ng/ml	6.200.000	7.100.000	7.700.000	10.400.000	7.300.000	7.740.000	1585.244	
10 ng/ml	6.700.000	5.600.000	7.000.000	8.200.000	7.300.000	6.960.000	944.987	
100 ng/ml	6.400.000	6.600.000	6.200.000	6.600.000	5.800.000	6.320.000	334.664	0.05
6 h								
Kontrolle	70.000	60.000	50.000	60.000	90.000	66.000	15.166	
1 ng/ml	70.000	110.000	80.000	120.000	130.000	102.000	25.884	0.05
10 ng/ml	40.000	20.000	20.000	10.000	10.000	20.000	12.248	0.01
100 ng/ml	0	0	10.000	0	0	2.000	4.472	0.01
18 h								
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	
1 ng/ml	0	0	0	0	0	0	0	
10 ng/ml	0	0	0	0	0	0	0	
100 ng/ml	0	0	0	0	0	0	0	
(c) <i>P. gingivalis</i> M5-1-2								
	a	b	c	d	e	MW	SD	p-Wert
1 h								
Kontrolle	10.400.000	9.700.000	10.000.000	9.500.000	10.200.000	9.960.000	364.692	
1 ng/ml	10.600.000	10.700.000	9.400.000	12.000.000	9.800.000	10.500.000	1.000.000	
10 ng/ml	11.500.000	10.300.000	11.800.000	9.500.000	9.700.000	10.560.000	1.043.072	
100 ng/ml	7.300.000	9.200.000	8.800.000	9.300.000	8.500.000	8.620.000	804.363	0.05
6 h								
Kontrolle	8.200.000	8.000.000	6.600.000	10.000.000		8.200.000	1.395.230	
1 ng/ml	8.300.000	8.200.000	7.700.000	8.000.000		8.050.000	264.575	
10 ng/ml	9.200.000	10.500.000	9.300.000	9.000.000	9.400.000	9.480.000	589.067	
100 ng/ml	7.600.000	6.400.000	6.800.000	9.000.000	9.500.000	7.860.000	1.352.036	
18 h								
Kontrolle	6.300.000	6.000.000	5.600.000	7.300.000	5.800.000	6.200.000	667.083	
1 ng/ml	8.040.000	9.000.000	6.700.000	7.800.000	5.900.000	7.488.000	1.207.361	0.05
10 ng/ml	8.200.000	8.400.000	8.800.000	8.300.000	7.000.000	8.140.000	676.757	0.01
100 ng/ml	2.400.000	3.810.000	3.000.000	3.300.000	2.820.000	3.066.000	528.375	0.01

8 Tabellenanhang

Tab. 2: Rotwein ohne U-937-Zellen zu Abb. 8 im Kapitel 5.3, Seite 45
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

(a) <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4								
	a	b	c	d	e	MW	SD	p-Wert
1 h								
Kontrolle	1.010.000	810.000	1.030.000	1.470.000	680.000	1.000.000	300.167	
0,10 %	1.700.000	1.650.000	1.370.000	1.310.000	1.610.000	1.528.000	175.841	0.01
1 %	1.090.000	850.000	890.000	920.000	810.000	912.000	107.796	
10 %	70.000	220.000	180.000	120.000	80.000	134.000	64.653	0.01
6 h								
Kontrolle	630.000	580.000	560.000	250.000	560.000	516.000	151.427	
0,10 %	510.000	380.000	660.000	430.000	230.000	442.000	158.965	
1 %	100.000	230.000	690.000	60.000	210.000	258.000	251.933	0.05
10 %	10.000	0	10.000	10.000	0	6.000	5.477	0.01
18 h								
Kontrolle	390.000	430.000	410.000	520.000	690.000	488.000	123.369	
0,10 %	950.000	170.000	430.000	270.000	280.000	420.000	310.484	
1 %	60.000	80.000	90.000	30.000	40.000	60.000	25.495	0.01
10 %	0	0	0	0	0	0	0	0.01
(b) <i>P. gingivalis</i> ATCC 32277								
	a	b	c	d	e	MW	SD	p-Wert
1 h								
Kontrolle	8.300.000	6.900.000	7.500.000	7.000.000	7.800.000	7.500.000	578.792	
0,10 %	4.980.000	5.640.000	6.000.000	6.200.000	5.500.000	5.664.000	473.160	0.01
1 %	5.500.000	4.400.000	4.900.000	2.750.000	3.700.000	4.250.000	1.067.708	0.01
10 %	2.370.000	1.830.000	2.200.000	2.200.000	2.240.000	2.168.000	201.420	0.01
6 h								
Kontrolle	30.000	10.000	10.000	30.000	30.000	22.000	10.955	
0,10 %	0	0	0	0	0	0	0	0.01
1 %	0	0	0	0	0	0	0	0.01
10 %	0	0	0	0	0	0	0	0.01
18 h								
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	
0,10 %	0	0	0	0	0	0	0	
1 %	0	0	0	0	0	0	0	
10 %	0	0	0	0	0	0	0	
(c) <i>P. gingivalis</i> M5-1-2								
	a	b	c	d	e	MW	SD	p-Wert
1 h								
Kontrolle	8.000.000	9.800.000	8.000.000	7.500.000	9.000.000	8.460.000	926.283	
0,10 %	8.000.000	7.000.000	7.300.000	6.300.000	5.700.000	6.860.000	890.506	0.05
1 %	5.300.000	5.700.000	5.200.000	7.200.000	6.100.000	5.900.000	809.321	0.01
10 %	1.300.000	940.000	730.000	810.000	1.980.000	1.152.000	511.732	0.01
6 h								
Kontrolle	8.200.000	9.000.000	8.000.000	6.600.000	6.800.000	7.720.000	1.005.982	
0,10 %	6.300.000	6.500.000	5.200.000	7.200.000	7.400.000	6.520.000	870.058	
1 %	2.000.000	3.000.000	3.200.000	2.500.000	2.590.000	2.658.000	467.247	
10 %	0	0	0	0	1000	200	447	
18 h								
Kontrolle	6.400.000	7.200.000	6.200.000	7.300.000	7.300.000	6.880.000	535.724	
0,10 %	2.410.000	3.140.000	4.750.000	2.500.000	3.000.000	3.160.000	942.364	0.01
1 %	0	0	0	0	0	0	0	0.01
10 %	0	0	0	0	0	0	0	0.01

8 Tabellenanhang

Tab. 3: Planktonisch vorkommende Bakterien und Resveratrol zu Abb. 4 im Kapitel 5.1.1, Seite 37
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

(a) <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4						
	a	b	c	d	MW	SD
1 h						
Kontrolle	2.620.000	1.720.000	1.040.000	1.160.000	1.635.000	720.440
1 ng/ml	930.000	2.090.000	800.000	1.000.000	1.205.000	595.791
10 ng/ml	1.410.000	1.240.000	1.520.000	1.110.000	1.320.000	181.292
100 ng/ml	1.680.000	1.230.000	1.100.000	1.750.000	1.440.000	323.213
6 h						
Kontrolle	1.540.000	1.119.000	220.000	490.000	842.250	598.532
1 ng/ml	530.000	900.000	420.000	150.000	500.000	310.805
10 ng/ml	1.110.000	1.870.000	280.000	300.000	890.000	759.166
100 ng/ml	440.000	1.130.000	460.000	320.000	587.500	366.913
18 h						
Kontrolle	230.000	1.450.000	150.000	50.000	470.000	657.470
1 ng/ml	310.000	670.000	10.000	30.000	255.000	308.707
10 ng/ml	1.300.000	1.140.000	20.000	10.000	617.500	698.779
100 ng/ml	950.000	1.720.000	80.000	20.000	692.500	806.117
(b) <i>P. gingivalis</i> ATCC 32277						
	a	b	c	d	MW	SD
1 h						
Kontrolle	5.500.000	4.300.000	1.830.000	2.640.000	3.567.500	1.648.259
1 ng/ml	6.400.000	5.000.000	3.870.000	3.840.000	4.777.500	1.208.922
10 ng/ml	3.760.000	5.700.000	2.090.000	3.310.000	3.715.000	1.499.656
100 ng/ml	5.000.000	7.800.000	2.890.000	2.490.000	4.545.000	2.433.386
6 h						
Kontrolle	4.500.000	4.880.000	1.030.000	970.000	2.845.000	2.136.204
1 ng/ml	4.900.000	4.850.000	590.000	720.000	2.765.000	2.437.082
10 ng/ml	4.040.000	4.550.000	880.000	690.000	2.540.000	2.038.643
100 ng/ml	4.300.000	4.860.000	1.090.000	650.000	2.725.000	2.161.612
18 h						
Kontrolle	1.430.000	2.430.000	280.000	300.000	1.110.000	1.031.148
1 ng/ml	240.000	2.470.000	360.000	370.000	860.000	1.074.957
10 ng/ml	240.000	1.870.000	440.000	280.000	707.500	779.802
100 ng/ml	1.830.000	1.160.000	310.000	440.000	935.000	704.107
(c) <i>P. gingivalis</i> M5-1-2						
	a	b	c	d	MW	SD
1 h						
Kontrolle	12.000.000	10.000.000	11.800.000	11.200.000	11.250.000	900.000
1 ng/ml	9.000.000	8.400.000	9.900.000	7.600.000	8.725.000	970.824
10 ng/ml	11.000.000	8.800.000	11.500.000	12.000.000	10.825.000	1.410.378
100 ng/ml	11.200.000	14.000.000	10.150.000	13.200.000	12.137.500	1.772.651
6 h						
Kontrolle	11.600.000	11.200.000	8.200.000	10.800.000	10.450.000	1.535.144
1 ng/ml	10.800.000	11.200.000	6.700.000	8.900.000	9.400.000	2.060.744
10 ng/ml	17.000.000	11.600.000	9.300.000	8.400.000	11.575.000	3.859.512
100 ng/ml	13.000.000	10.000.000	11.000.000	12.700.000	11.675.000	1.422.146
18 h						
Kontrolle	3.320.000	2.300.000	6.200.000	8.300.000	5.030.000	2.734.886
1 ng/ml	2.020.000	1.360.000	8.500.000	12.000.000	5.970.000	5.151.582
10 ng/ml	1.870.000	1.830.000	8.800.000	8.060.000	5.140.000	3.810.993
100 ng/ml	730.000	1.820.000	8.200.000	8.520.000	4.817.500	4.116.733

8 Tabellenanhang

Tab. 4: Planktonisch vorkommende Bakterien und Rotwein zu Abb. 4 im Kapitel 5.1.1, Seite 37
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

(a) <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4							
	a	b	c	d	MW	SD	p-Wert
1 h							
Kontrolle	1.310.000	1.210.000	2.450.000	2.160.000	1.782.500	616.191	
0,10 %	1.290.000	1.960.000	2.290.000	2.150.000	1.922.500	442.822	
1 %	1.000.000	1.470.000	1.980.000	1.680.000	1.532.500	412.098	
10 %	1.370.000	1.420.000	2.240.000	2.610.000	1.910.000	613.895	
6 h							
Kontrolle	320.000	260.000	1.390.000	1.270.000	810.000	602.937	
0,10 %	210.000	310.000	1.610.000	980.000	777.500	651.837	
1 %	330.000	160.000	534.000	1.000.000	506.000	363.094	
10 %	30.000	90.000	258.000	318.000	174.000	136.118	0.05
18 h							
Kontrolle	60.000	70.000	139.000	95.000	91.000	35.223	
0,10 %		120.000	94.000	108.000	107.333	13.013	
1 %	60.000	390.000	150.000	170.000	192.500	140.089	
10 %	10.000		18.100	38.800	22.300	14.852	0.05
(b) <i>P. gingivalis</i> ATCC 32277							
	a	b	c	d	MW	SD	p-Wert
1 h							
Kontrolle	2.000.000	3.000.000	8.310.000	7.200.000	5.127.500	3.094.677	
0,10 %	1.000.000	1.200.000	7.120.000	6.750.000	4.017.500	3.373.212	
1 %	800.000	1.400.000	3.910.000	3.480.000	2.397.500	1.528.232	
10 %	730.000	2.600.000	6.750.000	6.540.000	4.155.000	2.976.066	
6 h							
Kontrolle	1.520.000	744.000	2.840.000	3.100.000	2.051.000	1.112.524	
0,10 %	880.000	2.000.000	3.050.000	2.280.000	2.052.500	898.939	
1 %	169.000	540.000	100.000	90.000	224.750	213.081	0.01
10 %	0	0	0	0	0	0	0.01
18 h							
Kontrolle	16.000	13.800	1.040.000	720.000	447.450	516.269	
0,10 %	150.000	170.000	1.020.000	3.900.000	1.310.000	1.773.640	
1 %	100	100	0	0	50	58	0.05
10 %	0	0	0	0	0	0	0.05
(c) <i>P. gingivalis</i> M5-1-2							
	a	b	c	d	MW	SD	p-Wert
1 h							
Kontrolle	14.000.000	12.000.000	4.000.000	4.000.000	8.500.000	5.259.911	
0,10 %	13.000.000	12.000.000	4.000.000	4.000.000	8.250.000	4.924.429	
1 %	10.000.000	15.000.000	5.000.000	4.000.000	8.500.000	5.066.228	
10 %	8.000.000	12.000.000	5.000.000	5.000.000	7.500.000	3.316.625	
6 h							
Kontrolle	12.000.000	8.400.000	4.000.000	3.000.000	6.850.000	4.158.125	
0,10 %	9.600.000	12.000.000	3.000.000	4.000.000	7.150.000	4.346.263	
1 %	8.800.000	12.000.000	3.000.000	4.000.000	6.950.000	4.212.284	
10 %	1.190.000	1.370.000	3.000	4.000	641.750	740.642	0.05
18 h							
Kontrolle	8.600.000	10.000.000	500.000	600.000	4.925.000	5.084.208	
0,10 %	9.000.000	10.000.000	700.000	700.000	5.100.000	5.097.058	
1 %	6.500.000	5.220.000	500.000	500.000	3.180.000	3.138.407	
10 %	0	10.000	0	0	2.500	5.000	0.05

8 Tabellenanhang

Tab. 5: Adhärenzte Bakterien und Resveratrol zu Abb. 5 im Kapitel 5.1.2, Seite 39
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

(a) <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4							
	a	b	c	d	MW	SD	p-Wert
1 h							
Kontrolle	16.000	64.000		6.000	28.667	31.005	
1 ng/ml	38.000	14.000	6.000	10.000	17.000	14.376	
10 ng/ml	35.000	18.000		4.000	19.000	15.524	
100 ng/ml	11.000	5.000	8.000	1.000	6.250	4.272	
6 h							
Kontrolle	8.000	23.000	7.000	4.000	10.500	8.505	
1 ng/ml	37.000	25.000	52.000	12.000	31.500	17.059	
10 ng/ml	2.000	1.000	9.000		5.250	4.349	
100 ng/ml	3.000	10.000	3.000	17.000	8.250	6.702	
18 h							
Kontrolle	44.000	63.000	10.000	25.000	35.500	23.014	
1 ng/ml	69.000	64.000	27.000	7.000	41.750	29.792	
10 ng/ml	201.000	36.000	102.000	11.000	87.500	84.847	
100 ng/ml	110.000	44.000	10.000	8.000	43.000	47.624	
(b) <i>P. gingivalis</i> ATCC 32277							
	a	b	c	d	MW	SD	p-Wert
1 h							
Kontrolle	9.000		16.000	23.000	16.000	7.000	
1 ng/ml	1.000	192.000	17.000	7.000	54.250	92.070	
10 ng/ml		268.000	10.000	30.000	102.667	143.532	
100 ng/ml	4.000	197.000	31.000	30.000	65.500	88.553	
6 h							
Kontrolle	1.000	6.000	54.000	75.000	34.000	36.304	
1 ng/ml	2.000	206.000	111.000	75.000	98.500	84.808	
10 ng/ml	1.000	527.000	54.000	67.000	162.250	244.837	
100 ng/ml	33.000	408.000	50.000	35.000	131.500	184.489	
18 h							
Kontrolle	281.000	181.000	52.000	60.000	143.500	109.021	
1 ng/ml	510.000	184.000	61.000	49.000	201.000	214.844	
10 ng/ml	336.000	27.000	104.000	43.000	127.500	142.904	
100 ng/ml	36.000	327.000	69.000	57.000	122.250	137.180	
(c) <i>P. gingivalis</i> M5-1-2							
	a	b	c	d	MW	SD	p-Wert
1 h							
Kontrolle	62.000	43.000	42.000	96.000	60.750	25.237	
1 ng/ml	23.000	16.000	35.000	49.000	30.750	14.477	0.05
10 ng/ml	17.000	28.000	12.000	15.000	18.000	6.976	0.05
100 ng/ml	6.000	6.000	43.000	14.000	17.250	17.576	0.05
6 h							
Kontrolle	222.000	149.000	458.000	315.000	286.000	133.279	
1 ng/ml	150.000	200.000	219.000	129.000	174.500	42.036	
10 ng/ml	106.000	146.000	105.000	121.000	119.500	19.122	0.05
100 ng/ml	89.000	86.000	59.000	35.000	67.250	25.382	0.01
18 h							
Kontrolle	772.000	780.000	406.000	320.000	569.500	241.039	
1 ng/ml	720.000	640.000	889.000	533.000	695.500	150.032	
10 ng/ml	640.000	815.000	136.000	320.000	477.750	306.453	
100 ng/ml	650.000	836.000	73.000	150.000	427.250	373.744	

8 Tabellenanhang

Tab. 6: Adhärenzte Bakterien und Rotwein zu Abb. 5 im Kapitel 5.1.2, Seite 39
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

(a) <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4							
	a	b	c	d	MW	SD	p-Wert
1 h							
Kontrolle	3.000	6.000	27.000	11.000	11.750	10.689	
0,10 %	28.000	3.000	10.000	23.000	16.000	11.518	
1 %	22.000	2.000	27.000	20.000	17.750	10.905	
10 %	3.000	2.000	32.100	27.100	16.050	15.784	
6 h							
Kontrolle	8.000	19.000	143.000	59.000	57.250	61.223	
0,10 %	20.000	13.000	84.000	113.000	57.500	48.884	
1 %	54.000	23.000	286.000	442.000	201.250	198.829	
10 %	30.000	15.000	65.100	100.000	52.525	37.980	
18 h							
Kontrolle	17.000	71.000	120.000	150.000	89.500	58.278	
0,10 %	43.000	100.000	180.000	150.000	118.250	60.047	
1 %	119.000	41.000	170.000	220.000	137.500	76.413	
10 %	8.000	4.000	53.700	80.000	36.425	36.772	
(b) <i>P. gingivalis</i> ATCC 32277							
	a	b	c	d	MW	SD	p-Wert
1 h							
Kontrolle	64.700	115.000	273.000	347.000	199.925	132.249	
0,10 %	150.000	100.000	144.000	97.000	122.750	28.135	
1 %	17.500	36.600	68.000	59.000	45.275	22.741	0.05
10 %	35.700	41.700	18.000	24.000	29.850	10.790	0.05
6 h							
Kontrolle	200.000	180.000	531.000	647.000	389.500	235.322	
0,10 %	180.000	240.000	355.000	372.000	286.750	92.208	
1 %	50.000	130.000	253.000	174.000	151.750	84.799	0.05
10 %	1.300	0	20.000	12.000	8.325	9.460	0.01
18 h							
Kontrolle	120.000	80.000	346.000	445.000	247.750	176.088	
0,10 %	216.000	126.000	133.000	132.000	151.750	42.945	
1 %	800	2.200	132.000	29.000	41.000	62.039	0.05
10 %	0	0	1.000	0	250	500	0.05
(c) <i>P. gingivalis</i> M5-1-2							
	a	b	c	d	MW	SD	p-Wert
1 h							
Kontrolle	105.000	75.000	74.000	83.000	84.250	14.408	
0,10 %	55.000	64.000	73.700	104.600	74.325	21.580	
1 %	38.000	34.000	76.500	87.600	59.025	27.020	0.05
10 %	11.000	23.000	31.700	57.800	30.875	19.855	0.01
6 h							
Kontrolle	487.000	436.000	180.000	150.000	313.250	172.880	
0,10 %	342.000	257.000	140.000	105.000	211.000	108.864	
1 %	319.000	465.000	154.000	115.000	263.250	160.960	
10 %	58.000	55.000	1.200	800	28.750	32.067	0.05
18 h							
Kontrolle	478.000	428.000	180.000	140.000	306.500	171.171	
0,10 %	252.000	215.000	200.000	120.000	196.750	55.638	
1 %	529.000	458.000	152.000	92.000	307.750	217.817	
10 %	1.000	2.000	700	300	1.000	726	0.01

8 Tabellenanhang

Tab. 7: IL-8-Sekretion der U-937-Zellen und Resveratrol bei Zugabe von *A. actinomycetemcomitans* Y4 zum Kapitel 5.2 ab Seite 38
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; K: Kontrollwert)

	K	MW	SD (K)	SD (MW)
1 h				
Kontrolle	1,33	0	0,83	0
1 ng/ml	0,50	0	0,63	0
10 ng/ml	0,63	0,05	0,13	0,07
100 ng/ml	0,83	0,05	0,56	0,07
6 h				
Kontrolle	1,33	3,25	1,61	0,64
1 ng/ml	0,50	3,20	0,46	0,57
10 ng/ml	0,63	1,80	0,75	0,14
100 ng/ml	0,83	1,50	0,93	0,28
18 h				
Kontrolle	0,83	7,30	1,27	0,14
1 ng/ml	0,63	4,75	0,76	0,78
10 ng/ml	0,13	1,80	0,12	0,42
100 ng/ml	0,57	3,00	0,64	0,85

Tab. 8: IL-8-Sekretion der U-937-Zellen und Rotwein bei Zugabe von *A. actinomycetemcomitans* Y4 zum Kapitel 5.2 ab Seite 38
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; K: Kontrollwert)

	K	MW	SD (K)	SD (MW)
1 h				
Kontrolle	0,87	0,05	1,17	0,07
1 ng/ml	2,23	0	2,63	0
10 ng/ml	1,10	0	0,23	0
100 ng/ml	0	0	0	0
6 h				
Kontrolle	0,87	26,90	0,67	4,10
1 ng/ml	2,23	60,45	1,76	27,90
10 ng/ml	1,10	0,55	1,90	0,49
100 ng/ml	0	0	0	0
18 h				
Kontrolle	1,16	18,15	1,93	0,92
1 ng/ml	2,63	37,40	3,52	17,54
10 ng/ml	0,23	11,95	0,40	12,94
100 ng/ml	0	0	0	0

8 Tabellenanhang

Tab. 9: TNF- α -Sekretion der U-937-Zellen und Rotwein zum Kapitel 5.2 ab Seite 38
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; K: Kontrollwert)

(a) bei Zugabe von <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4				
	K	MW	SD (K)	SD (MW)
1 h				
Kontrolle	0	0	0	0
0,1 %	0	0	0	0
1 %	0	0	0	0
10 %	317,76	578,70	274,30	116,80
6 h				
Kontrolle	0	0	0	0
0,1 %	0,47	10,2	0,81	0
1 %	0	0	0	0
10 %	391,57	309,80	337,87	97,01
18 h				
Kontrolle	0	0	0	0
0,1 %	0	12,10	0	0
1 %	0	0	0	0
10 %	164,90	164,85	138,95	103,59
(b) bei Zugabe von <i>P. gingivalis</i> ATCC 32277				
	K	MW	SD (K)	SD (MW)
1 h				
Kontrolle	0	0	0	0
0,1 %	0	0	0	0
1 %	0	0	0	0
10 %	317,77	356,05	274,32	35,21
6 h				
Kontrolle	0	0	0	0
0,1 %	0,47	0	0,81	0
1 %	0	17,80	0	2,40
10 %	391,57	279,00	337,87	73,12
18 h				
Kontrolle	0	0	0	0
0,1 %	0	2,53	0	4,39
1 %	0	10,27	0	17,78
10 %	164,90	384,37	138,95	56,71
(c) bei Zugabe von <i>P. gingivalis</i> M5-1-2				
	K	MW	SD (K)	SD (MW)
1 h				
Kontrolle	0	0	0	0
0,1 %	0	0	0	0
1 %	0	0	0	0
10 %	317,77	254,33	274,32	89,00
6 h				
Kontrolle	0	0	0	0
0,1 %	0,47	0	0,81	0
1 %	0	0	0	0
10 %	391,57	381,46	337,87	8,68
18 h				
Kontrolle	0	0	0	0
0,1 %	0	0	0	0
1 %	0	0	0	0
10 %	164,90	211,68	138,95	126,24

Lebenslauf

Persönliche Daten

Carolin Köditz
wohnhaft in Jena
geb. am 24. 02. 1973 in Zwickau
verheiratet, 3 Kinder

Schulbildung

09/1979–02/1983 Polytechnische Oberschule Richard-Braune Zwickau
03/1983–07/1989 Polytechnische Oberschule Siegmund-Jähn Zwickau
30.06.1989 Abschlussprüfung
08/1995–07/1998 Abendgymnasium Zwickau
04.07.1998 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

09/1989–02/1993 Ausbildung zur Zahntechnikerin
26.02.1993 Gesellenbrief

Berufstätigkeit

03/1993–10/1993 Dentallabor Klausch und Gelbe, Zwickau
11/1993–10/1998 Leuner und Herren Dentallabor, Zwickau

Hochschulstudium

10/1998–12/2005	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
03/2001–03/2002	Erziehungszeit
09/2003–09/2004	Erziehungszeit
08.12.2005	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)

Promotion

01/2006–03/2007	Durchführung der Experimente und Beginn der Niederschrift
04/2007–04/2008	Erziehungszeit
05/2008–10/2009	Fertigstellung der Niederschrift

Zahnärztliche Tätigkeit

seit 09/2008	Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dr. Janett Pertsch, Hermsdorf
--------------	--

Danksagung

Ich bedanke mich bei

- Herrn Prof. Dr. Wolfgang Pfister für die Vergabe und Betreuung der Promotion
- Frau PD Dr. Sigrun Eick, die mich durch ihre engagierte Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft mit vielseitigen Denkanstößen bereicherte und bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat
- Frau Claudia Ranke für ihre vielen Hinweise und ihr Engagement während meines Aufenthaltes im Labor
- meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung das Studium und diese Arbeit ermöglichten und sie mit Anteilnahme verfolgt haben
- meinem Mann für seine große Geduld und Hilfe in allen Lebenslagen
- meinen Kindern – ohne Euch wären die Tage ohne Sonnenschein!

Carolin Köditz

Im November 2009

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die angegebenen Teile der Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Eick
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 12. 11. 2009

Unterschrift des Verfassers